



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS

**PAPEL DEL MOTIVO LEXE DE LAS DNA POLIMERASAS QUE INICIAN CON
PROTEÍNA TERMINAL EN LA INTERACCIÓN CON EL NUCLEÓTIDO
ENTRANTE. ESTABILIZACIÓN DE LOS SUSTRATOS EN EL CENTRO ACTIVO
DE POLIMERIZACIÓN MEDIADA POR EL SUBDOMINIO TPR1**

TESIS DOCTORAL
M^a Eugenia Santos Del Río
Madrid, 2017



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS

**PAPEL DEL MOTIVO LEXE DE LAS DNA POLIMERASAS QUE INICIAN CON
PROTEÍNA TERMINAL EN LA INTERACCIÓN CON EL NUCLEÓTIDO
ENTRANTE. ESTABILIZACIÓN DE LOS SUSTRATOS EN EL CENTRO ACTIVO
DE POLIMERIZACIÓN MEDIADA POR EL SUBDOMINIO TPR1**

Memoria presentada por la Lda. en Biología M^a Eugenia Santos Del Río para optar al grado de Doctora en Biología Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, junio 2017

Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC/UAM) bajo la dirección de la Doctora Margarita Salas Falgueras y el Doctor Miguel de Vega José. Para su realización se contó con una beca del Programa de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

Mis estudios científicos me han brindado una gran satisfacción, y estoy convencido de que no pasará mucho tiempo antes de que todo el mundo reconozca los resultados de mi trabajo.

Gregor Mendel

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a Margarita la oportunidad de poder trabajar en su grupo de investigación. Gracias por dejarme aprender tanto, por los ánimos, por ese "venga, que esto sale" constante, por la paciencia y positividad.

A Miguel, que ha sabido guiarme a cada paso, a pesar de los tropezones, de los callejones sin salidas o de las interminables K_m. Mil gracias por tu tiempo, soy consciente de lo difícil que era sacarlo.

A José M^a y Laurentino, siempre dispuestos a echar una mano, a dar un consejo o a dar lo necesario para poder trabajar día a día.

M^a Ángeles, ¡qué habría hecho sin ti! Siempre atenta a ese maldito papeleo que me trae de cabeza. Gracias por estar ahí para todo, por ser tan cariñosa y acogernos siempre tan bien.

Gracias a todos mis compañeros, por tener la paciencia y las ganas de echarme una mano cuando entré perdida. Por tantos y tantos consejos, por poco tiempo que hayamos coincidido (Benito, Laura, Mónica, Ana, Modesto) o mucho (David, Alicia, Irene, Isa, Mojardín, Pablo, Mario). Gracias por estar ahí.

Pero sin duda no habría podido llegar hasta aquí, sin mis chicas. Esa U2 que hacía que no dolieran los madrugones o los experimentos de 12h. Las que me han levantado y animado cada vez que he caído, y han sido unas cuantas... Las que me han demostrado que son más que compañeras. Gracias por ser mis Amigas. Sin duda, sois lo mejor que me llevo junto a esta tesis. (MLuisa, Sandra y Belén, esto también va por vosotras).

Aunque no sean de ciencias ni hayan participado de forma activa en esta tesis, no puedo dejar de agradecer a mis "bailongos" el haberos conocido. Me habéis acompañado, de otra manera, pero no menos importante, durante todo el camino y os aseguro que sin esos ratos de desconexión después de un día duro de trabajo, tampoco lo hubiera conseguido. Gracias por darme tanta ilusión, tantas risas y tantos buenos ratos familia SyP. (Max, por fin vas a dejar de preguntar).

Miriam y José, me habéis caído del cielo. Gracias por ese último empujón que tanto necesitaba.

Y para acabar, como no puede ser de otra manera, GRACIAS FAMILIA. Por apoyar sin presionar, por creer y estar orgullosos siempre, pase lo que pase. Os quiero, sin más.

Resumen.....	5
Summary	7
Abreviaturas.....	9
Glosario de términos no castellanos incluidos en esta Tesis	11
INTRODUCCIÓN	15
1. Las DNA polimerasas	15
1.1. Clasificación de las DNA polimerasas	15
1.2. Estructura general de las DNA polimerasas	18
1.3. Características funcionales de las DNA polimerasas	20
1.4. Mecanismo de polimerización	21
1.5. Fidelidad de síntesis y capacidad correctora de errores.....	23
2. La replicación del DNA	23
3. Mecanismo de replicación iniciada por proteína terminal	25
3.1. Replicación del genoma del bacteriófago $\phi 29$	25
3.2. Características funcionales de la DNA polimerasa de $\phi 29$	26
3.3. Estructura de la DNA polimerasa de $\phi 29$	27
3.4. Estructura del heterodímero formado por la DNA polimerasa y la proteína terminal de $\phi 29$	30
OBJETIVOS	35
MATERIALES Y MÉTODOS	39
1. Materiales	39
1.1. Nucleótidos.....	39
1.2. Proteínas	39
1.3. Sustratos de DNA	39
2. Métodos	40
2.1. Mutagénesis dirigida y expresión de las DNA polimerasas mutantes	40
2.2. Balance de las actividades de polimerización y exonucleólisis 3'-5'	40
2.3. Ensayo de la actividad exonucleasa 3'-5'	40
2.3.1. Actividad exonucleasa 3'-5' sobre DNA.....	40
2.3.2. Hidrólisis del 5'- <i>p</i> -nitrofenil éster de timidina 5'-monofosfato (<i>p</i> NP-TMP).....	41
2.4. Ensayo de interacción de la DNA polimerasa con sustratos de DNA.....	41

2.5. Transferencia del <i>primer</i> desde el centro activo de polimerización al centro activo de exonucleolisis	41
2.6. Transferencia del extremo 3' del <i>primer</i> desde el centro activo de exonucleolisis 3'-5' al centro activo de polimerización.....	42
2.7. Ensayo de fidelidad de inserción de nucleótidos.....	42
2.8. Ensayo de síntesis procesiva acoplada al desplazamiento de banda (replicación del DNA de M13).....	43
2.9. Ensayo de replicación del TP-DNA de $\phi 29$	43
2.10. Ensayo de iniciación de la replicación (formación del complejo TP-dAMP)	44
2.11. Ensayo de amplificación del TP-DNA de $\phi 29$	44
2.12. Ensayo de interferencia	45
2.13. Ensayo de cosedimentación	45
2.14. Ensayo de pirofosforolisis.....	45
 RESULTADOS	 51
1. Capítulo I: Estudios del motivo LExE de la DNA polimerasa de $\phi 29$	51
1.1. El motivo LExE de las DNA polimerasas replicativas	51
1.2. Mutagénesis dirigida a los residuos del motivo LExE	53
1.3. Actividad de polimerización de las DNA polimerasas mutantes	53
1.4. Afinidad por nucleótidos de las DNA polimerasas mutantes de $\phi 29$	55
1.5. Síntesis procesiva de DNA acoplada al desplazamiento de banda de las DNA polimerasas mutantes.....	57
1.6. Comportamiento de las DNA polimerasas mutantes en los procesos de iniciación y replicación del TP-DNA de $\phi 29$	58
1.7. Actividad pirofosforolítica de las DNA polimerasas mutantes	60
2. Capítulo II: Implicación del subdominio TPR1 de la DNA polimerasa de $\phi 29$ en la estabilización de los sustratos DNA y TP	63
2.1. Construcción de las DNA polimerasas mutantes en el dominio TPR1 de la DNA polimerasa de $\phi 29$	66
2.2. Los mutantes Y310A y $\Delta 6$ no mantienen un correcto balance entre las actividades de polimerización y exonucleolisis 3'-5'	67
2.3. Las DNA polimerasas mutantes conservan la integridad de su centro activo de exonucleolisis	68
2.4. Actividad exonucleasa 3'-5' sobre DNA de las DNA polimerasas <i>wild-type</i> y mutantes	69
2.5. Las DNA polimerasas mutantes transfieren intramolecularmente el extremo de la cadena iniciadora entre sus centros activos de polimerización y exonucleolisis	71

2.6. Las DNA polimerasas mutantes interaccionan preferentemente con sustratos de banda simple	74
2.7. La DNA polimerasa mutante Y310A tiene afectada su actividad de replicación del DNA de M13	76
2.8. Los mutantes F309A y Y310A tienen disminuida su capacidad de amplificación del TP-DNA de ϕ 29	77
2.9. Las DNA polimerasas mutantes R306A, F309A, Y310A y Δ 6 muestran defectos en la reacción de iniciación de la replicación del TP-DNA	78
2.10. Las DNA polimerasas mutantes R306A, F309A, Y310A y Δ 6 exhiben una interacción deficiente con la TP	79
2.11. Las DNA polimerasas mutantes no muestran defectos en la etapa de transición de la replicación del TP-DNA	81
DISCUSIÓN	87
1. Importancia del motivo LExE en el correcto posicionamiento del nucleótido entrante	87
1.1. Papel estructural de los residuos Gly481 y Trp483 del motivo LExE en la formación de un "bolsillo" hidrofóbico que acoge al dNTP entrante	87
1.2. El residuo Glu486 de la DNA polimerasa de ϕ 29 podría estar interaccionando con un tercer ión metálico no catalítico	89
2. Importancia del <i>loop</i> del subdominio TPR1 en la correcta estabilización de la molécula iniciadora en el centro activo de polimerización	90
2.1. Papel del <i>loop</i> del subdominio TRP1 en la estabilización del extremo del <i>primer</i> de DNA al centro activo de polimerización	91
2.2. Papel del <i>loop</i> del subdominio TRP1 en la estabilización del dominio de iniciación de la TP al centro activo de polimerización	92
CONCLUSIONES	97
BIBLIOGRAFÍA	101

El motivo LExE se encuentra conservado en todas las DNA polimerasas del tipo eucariota, y se localiza cerca del centro activo de polimerización. Estudios previos sugieren que el segundo Glu interacciona con el tercer ion no catalítico en la DNA polimerasa de RB69. En el subgrupo de las DNA polimerasas que inician la replicación con proteína terminal (TP), el primer Glu del motivo LExE está sustituido por Phe/Trp y precedido por una Gly. Se construyeron mutantes puntuales para los residuos aminoácidos Gly481, Trp483, Ala484 y Glu486 pertenecientes a la DNA polimerasa de $\phi 29$. Los resultados obtenidos junto a la resolución cristalográfica de la estructura del complejo ternario de la DNA polimerasa de $\phi 29$ nos permiten concluir que la Gly481 y el Trp483 podrían estar formando un bolsillo donde se acomoda la cadena lateral de la Val250, orientándola correctamente para interaccionar con el dNTP entrante. Los mutantes en el residuo Glu486 son también deficientes en polimerización y, como los mutantes en los residuos Gly481 y Trp483, en la actividad de pirofosforólisis cuando se usa el ion Mg^{2+} , recuperando ambas actividades en presencia de Mn^{2+} e indicando un posible papel del Glu486 en la interacción con la fracción de pirofosfato del dNTP.

La DNA polimerasa del fago $\phi 29$ contiene dos subdominios denominados TPR1 y TPR2 (Terminal Protein Region), específicos de las DNA polimerasas del subgrupo de *Protein-priming*. Estudios previos llevados a cabo sobre la región TPR1 de la DNA polimerasa de $\phi 29$ revelaron que este subdominio establece las principales interacciones con la TP, además de contribuir a la correcta orientación tanto del extremo 3'-OH de una cadena iniciadora de DNA como del grupo OH- de la Ser232 de la TP en el centro activo de polimerización (Dufour *et al.*, 2000; Dufour *et al.*, 2003). El estudio de los residuos del subdominio TPR1 localizados en el *loop* y situados en la entrada del surco de unión de los sustratos de la polimerasa, DNA y TP, permiten concluir un papel en la unión y/o estabilización de la molécula iniciadora en el centro activo de polimerización para el residuo Tyr310. Además, el residuo Tyr310 es importante para la correcta estabilización de la TP iniciadora en el centro activo de polimerización de la DNA polimerasa durante los procesos de síntesis de DNA. Así mismo, los mutantes puntuales R306A y F309A presentan deficiencias en las reacciones de iniciación de la replicación y posterior elongación cuando se utiliza como iniciador la proteína terminal, a pesar de cosedimentar con esta última. Estos resultados indican que las DNA polimerasas mutantes no son capaces de situar de manera correcta el dATP iniciador en el centro activo de polimerización, sugiriendo que los residuos Arg306 y Phe309 contribuyen a la correcta orientación del grupo OH- de la Ser232 en la iniciación de la replicación del genoma del fago.

The LExE motif is conserved in the eukaryotic-type DNA polymerases being located close to the polymerization active site. Previous researches suggested that the second Glu was involved in binding a third noncatalytic ion in bacteriophage RB69 DNA polymerase. In the *Protein-priming* DNA polymerases subgroup, the LEXE motif lacks the first Glu in most cases, but it has a conserved Phe/Trp and a Gly preceding it. To ascertain the role of those residues, we have analyzed the behavior of mutants at the corresponding ϕ 29 DNA polymerase residues Gly481, Trp483, Ala484, and Glu486. We show that mutations at Gly481 and Trp483 hamper insertion of the incoming dNTP in the presence of Mg^{2+} ions, a reaction highly improved when Mn^{2+} was used as metal activator. These results, together with previous crystallographic resolution of ϕ 29 DNA polymerase ternary complex, allow us to infer that Gly481 and Trp483 could form a pocket that orients Val250 to interact with the incoming dNTP. Mutants at Glu486 are also defective in polymerization and, as mutants at Gly481 and Trp483, in the pyrophosphorolytic activity with Mg^{2+} . Recovery of both reactions with Mn^{2+} supports a role for Glu486 in the interaction with the pyrophosphate moiety of the dNTP.

ϕ 29 DNA polymerase contains two subdomains, named TPR1 and TPR2 (Terminal Protein Region), specifically present in the protein-priming DNA polymerases subgroup. Previous studies revealed an important role of the TPR1 subdomain in establishing the main interactions with TP. It also contributes to the right orientation of both, the terminal 3'-OH group of the primer DNA strand and the OH- group of the TP residue Ser232 at the polymerization active site (Dufour *et al.*, 2000; Dufour *et al.*, 2003). In the second part of this work we have focused on specific residues of the TPR1 subdomain loop which are localized at the entrance of the DNA and TP binding groove. Our results allow us to conclude a role for Tyr310 in the correct stabilization/orientation of the priming molecule at the polymerization active site during the DNA synthesis process. Likewise, we have shown that R306A y F309A mutants exhibit defects during initiation of replication and further elongation when using a TP as primer, despite of cosedimenting with the latter protein. Altogether, the results indicate that the mutant DNA polymerases are unable to place correctly the initiator dATP molecule at the polymerization active site, suggesting that residues Arg306 y Phe309 contribute to the correct orientation of the OH- group of TP Ser232 during the initiation of phage genome replication.

ATP: adenosina-5'-trifosfato

BSA: seroalbúmina bovina (del inglés, **Bovine Serum Albumin**)

BER: reparación por escisión de bases (del inglés, **Base-Excision Repair**)

cm: centímetros

C-terminal: carboxilo terminal

DNA: ácido desoxirribonucleico (del inglés, **DeoxyriboNucleic Acid**)

DBP: proteína de unión a DNA de cadena doble (del inglés, **Double stranded DNA Binding Protein**)

dAMP: 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato

dATP: 2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato

dCTP: 2'-desoxicitidina-5'-trifosfato

dGTP: 2'-desoxiguanosina-5'-trifosfato

dTTP: 2'-desoxitimidina-5'-trifosfato

dNMP: 2'-desoxinucleósido-5'-monofosfato

dNTP: 2'-desoxinucleósido-5'-trifosfato

DRP: desoxirribosa fosfato

dsDNA: DNA de cadena doble (del inglés, **Double Stranded DNA**)

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilen-diamino-tetra-acético

Exo-: en esta tesis, variantes D12A/D66A de la DNA polimerasa de $\phi 29$

h: hora

Kb: kilobase

kDa: kiloDalton

mer: número de nucleótidos de un oligómero

min: minuto

nt: nucleótido.

N-terminal: amino terminal

NTP: ribonucleósido-5-trifosfato

OH: hidroxilo

p: peso

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida (del inglés, **PolyAcrylamide Gel Electrophoresis**)

pb: par de bases

PHP: dominio histidinol fosfatasa asociado a la polimerasa (del inglés, **Polymerase and Histidinol Phosphatase**)

pNP-TMP: éster de *p*-nitrofenil timidina monofosfato (del inglés, ***p*-NitroPhenyl ester of Thymidine MonoPhosphate**)

pNP: *p*-nitrofenol

φ29 TP-DNA: DNA del bacteriófago φ29 con una molécula de proteína terminal unida covalentemente a cada uno de sus extremos 5'

PPi: pirofosfato inorgánico

RNA: ácido ribonucleico (del inglés, **RiboNucleic Acid**)

RNasa H: ribonucleasa H

rpm: revoluciones por minuto

RT: transcriptasa reversa (del inglés, **Reverse Transcriptase**)

s: segundo

SDS: dodecil sulfato sódico (del inglés, **Sodium Dodecyl Sulphate**)

ssDNA: DNA de cadena sencilla (del inglés, **Single Stranded DNA**)

SSB: proteína de unión a DNA de cadena sencilla (del inglés, **Single Stranded DNA Binding protein**)

TdT: desoxinucleotidil transferasa terminal (del inglés, **Terminal Desoxynucleotidyl Transferase**)

TLS: síntesis translesiva (del inglés, **TransLesion Synthesis**)

TP: proteína terminal (del inglés, **Terminal Protein**)

TP-DNA: DNA con una molécula de TP unida covalentemente a cada uno de sus extremos 5'

TP-dAMP: complejo de iniciación formado por una proteína terminal y el nucleótido iniciador dAMP

TPR1/TPR2: del inglés, **Terminal Protein Region 1/2**

Tris: trihidroximetil aminometano

v: volumen

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

V_{max}: Velocidad máxima

VPPA: virus de la peste porcina africana

Cadena leading: cadena del DNA que se sintetiza de manera continua.

Cadena lagging: cadena del DNA que se sintetiza de manera discontinua mediante la síntesis de fragmentos de Okazaki y en dirección contraria al avance de la horquilla de replicación.

Clamp-loader: complejo proteico asociado a la horquilla de replicación encargado de ubicar, de manera dependiente de ATP, el factor de procesividad al extremo 3' del RNA iniciador.

Downstream: término empleado para referirse a la cadena de DNA que hibrida con la cadena molde y cuyo extremo 5' se localiza "hacia abajo" una distancia determinada del extremo 3' de la cadena iniciadora.

Gap: hueco o espacio de ssDNA de longitud variable existente en un dsDNA.

Kit: equipo o conjunto de materiales que se requieren para un proceso determinado.

Loop: estructura flexible a modo de bucle o lazo presente en determinados dominios de algunas proteínas.

Palm, fingers y thumb: subdominios que conforman el dominio de polimerización de las DNA y RNA polimerasas, llamados así por la similitud que presentan con la palma, dedos y pulgar de una mano derecha.

Primer: iniciador de la replicación. Puede ser un fragmento de RNA, de DNA, o el grupo hidroxilo de una proteína.

Sliding-back: término empleado para describir la translocación en sentido reverso del complejo TP-dAMP tras la reacción de iniciación.

Sliding-clamps: proteínas que interaccionan con las DNA polimerasas estabilizando su unión al DNA. Confieren una alta procesividad a las DNA polimerasas replicativas durante la replicación.

Upstream: término empleado para la cadena de DNA hibridada con la cadena molde y cuyo extremo 3' será utilizado como iniciador de la replicación por la DNA polimerasa.

Wild-type: tipo natural o silvestre, sin modificación genética.

INTRODUCCIÓN

Hasta mediados del siglo XX no se sospechaba que el ácido desoxirribonucleico, DNA, fuera la molécula capaz de asegurar la transmisión de los caracteres hereditarios de célula a célula, generación tras generación. Esta molécula contiene la información genética de la mayoría de los organismos vivos. Poco a poco, gracias al trabajo de numerosos científicos, se fueron desvelando detalles como su estructura, la manera en la que se encuentran apareadas las bases, o cómo se transmite la información genética. Y es justo en este último punto donde encontramos una serie de enzimas con un papel fundamental en la duplicación del material genético que se irá transmitiendo de generación a generación; estas enzimas son las polimerasas y pueden ser específicas de DNA o RNA. En esta tesis nos centraremos en el grupo de DNA polimerasas dependientes de DNA y profundizaremos en una DNA polimerasa en concreto, la DNA polimerasa del bacteriófago $\phi 29$.

1. LAS DNA POLIMERASAS

Las DNA polimerasas son las enzimas clave en el metabolismo del DNA. Están implicadas tanto en procesos de replicación y reparación como en procesos de recombinación y regulación del ciclo celular. La información sobre procesos tan complejos como éstos ha aumentado mucho en los últimos años gracias al descubrimiento y estudio de un gran número de DNA polimerasas. Muchos han sido los avances desde que el grupo de Arthur Kornberg descubriera la DNA polimerasa I de *Escherichia coli*, el primer ejemplo conocido de este tipo de enzimas (Lehmann *et al.*, 1958).

1.1. Clasificación de las DNA polimerasas

En base a las diferencias en la estructura primaria (Braithwaite e Ito, 1993; Delarue *et al.*, 1990; Ito y Braithwaite, 1991) y en el comportamiento frente a drogas inhibitorias, así como al análisis de la estructura tridimensional (Steitz *et al.*, 1994), las DNA polimerasas se clasifican en diferentes familias.

La familia A, llamada así por el gen *pol A* de *E. coli* que codifica a la DNA polimerasa I. Aquí encontramos DNA polimerasas replicativas y de reparación. Pertenecen a las primeras la DNA polimerasa de los bacteriófagos T3, T5 y T7, así como la DNA polimerasa mitocondrial eucariótica γ , aunque esta última también participa en procesos de reparación del DNA mitocondrial (Graziewicz *et al.*, 2006). En este sentido, la polimerasa γ tiene una actividad 5' desoxirribosa fosfato-liasa (dRP-liasa), que sugiere que pueda participar en la ruta de reparación por escisión de bases (BER) (Bogenhagen *et al.*, 2001). Las enzimas de reparación incluyen la DNA polimerasa I de *E. coli*, la Pol I de *Thermus aquaticus* (*Taq*) y la Pol I de *Bacillus stearothermophilus*, así como las dos DNA polimerasas identificadas en células humanas, Pol θ (Chan *et al.*, 2010; Yoon *et al.*, 2014) y Pol ν , implicada en la síntesis de DNA a través de lesiones (Yamanaka *et al.*, 2010).

Muchas de las DNA polimerasas de la familia A presentan actividad exonucleasa 5'-3', que interviene en el procesamiento de los fragmentos de Okazaki generados durante la síntesis de la cadena retrasada (Kornberg y Baker, 1992), así como una actividad exonucleasa 3'-5', responsable de la "corrección de errores" durante la replicación.

La familia B, llamadas DNA polimerasas de tipo II por su homología con la DNA polimerasa II de *E. coli* codificada por el gen *pol B*. Presentan una gran similitud con la DNA polimerasa α eucariótica por lo que también son conocidas como eucarióticas o de tipo α . Como el resto de DNA polimerasas replicativas, suelen estar formando parte de un complejo multiproteico llamado replisoma en el que están presentes, entre otros, factores de procesividad, helicasas y proteínas de unión a DNA de cadena sencilla (Kornberg y Baker, 1992). A esta familia pertenecen las DNA polimerasas α , δ y ϵ que llevan a cabo la replicación procesiva del DNA cromosómico durante la división celular en eucariotas (revisado en Garg y Burgers, 2005), la DNA polimerasa ζ (Lawrence, 2004; Nelson *et al.*, 1996), implicada en llevar a cabo la síntesis de DNA sobre sustratos "dañados" (síntesis translesiva, TLS), y la Pol σ (Kaguni, 2004), que interviene en la reparación de roturas de doble cadena por recombinación homóloga. Todas ellas se caracterizan por una potente actividad exonucleasa 3'-5', que puede llegar a ser más de 1.000 veces más eficiente que la caracterizada en las DNA polimerasas de la familia A (Capson *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 1994).

Las DNA polimerasas de la familia B se diferencian en tres grupos; celulares (como las eucarióticas α , δ , ϵ y ζ), bacterianas/virales (como la pol II de *E. coli* o las DNA polimerasas de los bacteriófagos T4 y RB69 y de los virus Vaccinia y Herpes) y un tercer grupo en el que encontramos las DNA polimerasas que inician la replicación a partir de un grupo hidroxilo (-OH) perteneciente a un residuo aminoácido de una proteína terminal (TP). A este último grupo pertenece la DNA polimerasa de ciertos bacteriófagos que tienen como genoma una molécula de DNA de doble cadena (dsDNA) lineal, como es el caso de los bacteriófagos ϕ 29, PRD1 y Cp1, de algunos virus eucariotas como adenovirus y hepadnavirus, plásmidos lineales, así como del cromosoma de *Streptomyces lividans* (revisado en Salas, 1991).

La familia C agrupa a las DNA polimerasas encargadas de la replicación del cromosoma bacteriano (Kornberg y Baker, 1992). Esta familia incluye a la DNA polimerasa III de *E. coli*, cuya subunidad catalítica (subunidad α) es codificada por el gen *pol C*, así como a las DNA polimerasas replicativas de la mayoría de bacterias Gram-positivas (Bruck *et al.*, 2003; Dervyn *et al.*, 2001). La subunidad α de *E. coli*, que contiene la actividad de polimerización, está asociada a la subunidad ϵ , responsable de la actividad exonucleasa 3'-5' (Kelman y O'Donnell, 1995). Cuando se obtuvo la primera estructura cristalina de una polimerasa replicativa bacteriana (Bailey *et al.*, 2006), se vio que a diferencia de las DNA polimerasas replicativas eucarióticas pertenecientes a las familias A y B, el subdominio *palm* de estas polimerasas presenta un plegamiento y conectividad idénticos a la familia X.

La familia D está formada por las DNA polimerasas encontradas en el subdominio euriarqueota. En este grupo encontramos las DNA polimerasas de *Pirococcus abyssi*, *P. horikoshii* o *P. furiosus*, que están compuestas por dos subunidades y no presentan secuencias de homología con ninguna otra DNA polimerasa conocida (Uemori *et al.*, 1997). Todas estas polimerasas funcionan como heterodímeros, con una subunidad mayor donde reside la actividad de polimerización (Shen *et al.*, 2001) y una subunidad menor responsable de la actividad exonucleasa 3'-5' (Uemori *et al.*, 1997; Gueguen *et al.*, 2001). Esta subunidad menor presenta ciertas homologías con la subunidad B de las DNA polimerasas α y ϵ (de humanos) y la DNA polimerasa δ , pertenecientes a la familia B de DNA polimerasas, lo que ha permitido establecer relaciones evolutivas entre eucariotas y arqueas (Yamasaki *et al.*, 2010; Cann *et al.*, 1998; Nuutinen *et al.*, 2008; Greenough *et al.*, 2014).

La familia X incluye DNA polimerasas implicadas fundamentalmente en procesos de reparación. Son enzimas monoméricas, distributivas y carecen de actividad correctora de errores. Además del dominio de polimerización, estas DNA polimerasas presentan un dominio N-terminal denominado “dominio de 8 kDa” que interacciona con el grupo fosfato 5' de la cadena *downstream* en un *gap* (Sawaya *et al.*, 1997). En algunos casos, este dominio posee actividad 5'-dRP-liasa, implicada en la ruta BER, importante para la reparación de los sitios abásicos presentes en el DNA (Matsumoto y Kim, 1995). Algunos miembros de esta familia tienen dominios adicionales como el dominio BRCT (dominio BRCA1 C-terminal), que desempeña un papel importante en interacciones proteína-proteína o proteína-DNA (Bork *et al.*, 1997; Callebaut y Mornon, 1997). Dentro de esta familia encontramos DNA polimerasas eucarióticas como la β (Abbotts *et al.*, 1988), que tiene preferencia por sustratos de DNA con pequeños gaps (Singhal y Wilson, 1993), la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) (Bollum, 1960), Pol λ (García-Díaz *et al.*, 2000; Aoufouchi *et al.*, 2000; Nagasawa *et al.*, 2000), Pol μ (Domínguez *et al.*, 2000), polimerasas de arqueas, de bacterias (como la PolX de *B. subtilis*) (Baños *et al.*, 2008a; Baños *et al.*, 2008b), y polimerasas de virus (como la Pol X del VPPA) (Oliveros *et al.*, 1997).

La familia Y son DNA polimerasas de tolerancia al daño y que durante la replicación del DNA son capaces de llevar a cabo la síntesis de DNA sobre sustratos portadores de lesiones, favoreciendo la supervivencia de la célula y su diversidad genética (Moldovan *et al.*, 2007). La presencia de agentes que dañan el DNA induce la expresión de este tipo de enzimas. Cuando se produce una parada en la horquilla de replicación como consecuencia de un daño en el DNA, estas DNA polimerasas son capaces de “interpretar” la información de la cadena dañada incorporando dNMPs, permitiendo así la continuidad del proceso replicativo. Exhiben elevadas tasas de error como consecuencia de una baja fidelidad de inserción, así como de la ausencia de actividad exonucleasa 3'-5' (Zhou *et al.*, 2001). Cada una de estas DNA polimerasas difiere en la especificidad que presentan sobre el sustrato en el que actúan. En *E. coli* se encuentran dos de estas polimerasas, la Pol IV (DinB) y la Pol V (UmuC) (Ohmori *et al.*, 2001). Proteínas

homólogos a UmuC y DinB existen en todas las eubacterias, y homólogos de DinB se han encontrado incluso en algunas arqueas (Kulaeva *et al.*, 1996). En humanos, han sido descritas la Pol η , ι , κ y una desoxicitidil transferasa dependiente de molde (Rev1) (McDonald *et al.*, 1999; Ohashi *et al.*, 2000; Yang, 2003).

La familia de las Transcriptasas Reversas (RTs) incluyen las RTs de retrovirus y las telomerasas eucarióticas. Las RTs interactúan con un amplio espectro de sustratos de ácidos nucleicos para convertir un genoma viral de RNA de cadena sencilla en un DNA proviral de doble cadena (Gotte *et al.*, 1999). Dentro de esta familia se han identificado polimerasas dimericas, como en el caso del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), y polimerasas monoméricas, como ocurre en el virus de la leucemia murina de Moloney (MuLV). Estas enzimas poseen un dominio polimerasa, así como un dominio RNasa H, este último con objeto de degradar el RNA viral durante la síntesis de DNA (Moelling *et al.*, 1971). En el caso de las telomerasas eucarióticas, estas DNA polimerasas utilizan como molde su propio RNA (Blackburn, 2001; Collins y Mitchell, 2002).

Recientemente se ha descrito una nueva actividad DNA polimerasa en las enzimas Primpol, perteneciente a la familia de primasas AE (*Archaeo-Eukaryotic*) que tiene un papel en la síntesis a través de lesiones tanto del DNA mitocondrial como nuclear. Su capacidad de iniciar la síntesis *de novo* de DNA le permite, en determinadas situaciones comenzar la síntesis de una nueva cadena de DNA en una localización *downstream* a la lesión, teniendo también un papel en reiniciar la síntesis del DNA en horquillas de replicación bloqueadas (García-Gómez *et al.*, 2013; Mourón *et al.*, 2013).

1.2. Estructura general de las DNA polimerasas

Gracias a la resolución de las estructuras cristalográficas de varias DNA polimerasas pertenecientes a diferentes familias se ha podido determinar que sus actividades de síntesis y de degradación residen en dominios estructuralmente separados. A pesar de la baja homología entre ellas, el dominio de polimerización presenta una conformación que se asemeja a una mano derecha ligeramente abierta (excepto en las DNA polimerasas de la familia X en las que se asemeja a una mano izquierda), diferenciándose tres subdominios: *palm*, *fingers* y *thumb* (siguiendo dicha analogía) (revisado en Joyce y Steitz, 1994; Joyce y Steitz, 1995) (ver Figura 1).

El subdominio *palm*, formado principalmente por láminas- β , es estructuralmente el más conservado, excepto en las DNA polimerasas de las familias C y X (Bailey *et al.*, 2006; Lamers *et al.*, 2006). Contiene los residuos que coordinan los dos iones metálicos divalentes responsables de la catálisis de la actividad de polimerización, así como los residuos implicados en la unión del extremo 3' de la cadena iniciadora y del fosfato α del dNTP entrante (revisado en Joyce y Steitz, 1995).

Los subdominios *fingers* y *thumb* están menos conservados estructuralmente (Brautigam y Steitz, 1998), pero conservan funciones en las diferentes DNA polimerasas. El subdominio *fingers*, formado generalmente por hélices- α , contiene una serie de residuos básicos que interaccionan electrostáticamente con los fosfatos del dNTP entrante correcto. La unión de éste al complejo DNA polimerasa-DNA promueve un cambio conformacional en el subdominio *fingers*, el cual rota hacia el *palm* completando la formación de un bolsillo hidrofóbico estructuralmente complementario a un par de bases naciente con geometría canónica Watson-Crick (Kunkel y Wilson, 1998; Patel *et al.*, 2001b; Yin y Steitz, 2004). De hecho, varios residuos del subdominio *fingers* y *palm* están involucrados en la fidelidad de inserción (Nick McElhinny *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 2001a; Pursell *et al.*, 2007; Saturno *et al.*, 1995; Shinkai y Loeb, 2001; Truniger *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 1999). El subdominio *fingers* también interacciona con la cadena molde, reorientándola en el centro activo de polimerización de forma adecuada para el correcto apareamiento con la base del dNTP entrante (Jacobo-Molina *et al.*, 1993; Kohlstaedt *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1997).

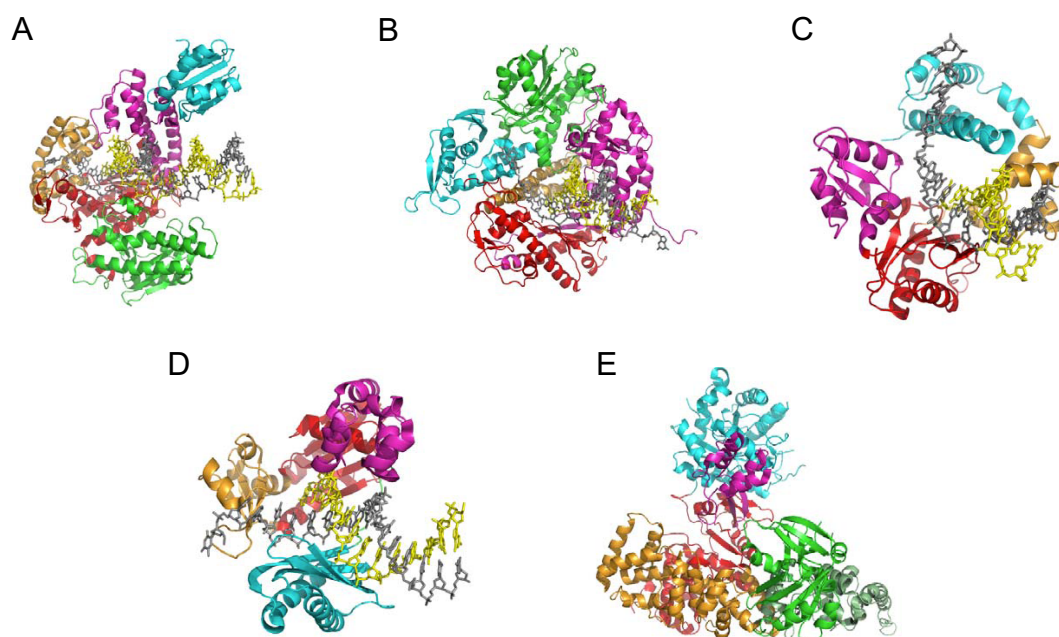


Figura 1. Representación de la estructura de DNA polimerasas pertenecientes a diferentes familias. (A) DNA polimerasa de T7 (familia A, PDB 1T7P). (B) DNA polimerasa de RB69 (familia B, PDB 1IG9). (C) DNA polimerasa β (familia X, PDB 1BPY), (D) DNA polimerasa Dpo4 (familia Y, PDB 1JX4) y (E) subunidad α de la DNA pol III de *E. coli* (familia C, PDB 2HQA). Las cadenas molde e iniciadora del DNA se muestran en gris y amarillo, respectivamente. Los subdominios *palm*, *fingers* y *thumb* se muestran en rojo, naranja y rosa, respectivamente, y el dominio de exonucleasa 3'-5' en verde. Así mismo se muestran otra serie de dominios o factores accesorios particulares de cada DNA polimerasa en color azul: tiorredoxina (factor de procesividad) en (A), dominio N-terminal en (B), dominio 8kDa en (D), dominio *little finger* en (C) y dominio PHP en (E).

El subdominio *thumb*, generalmente de carácter helicoidal, cambia su conformación al unirse al DNA, rotando hasta casi abrazar a éste por completo a través de su surco menor y estableciendo múltiples contactos inespecíficos con el esqueleto azúcar-fosfato del DNA

upstream (Doublé *et al.*, 1998; Eom *et al.*, 1996; Jacobo-Molina *et al.*, 1993; Kiefer *et al.*, 1998). Esta interacción hace que la unión de la DNA polimerasa al DNA sea más estable, favoreciendo la procesividad de la enzima (Doublé *et al.*, 1998; Goodrich *et al.*, 1997; Minnick *et al.*, 1996; Patel *et al.*, 1995; Truniger *et al.*, 2004a). También es el responsable de la coordinación entre las actividades de síntesis y degradación en las DNA polimerasas con actividad exonucleasa 3'-5' (Franklin *et al.*, 2001).

1.3. Características funcionales de las DNA polimerasas

Existen una serie de características presentes en la práctica totalidad de este grupo de enzimas, a pesar de la diversidad que presentan (Kornberg y Baker, 1992). Todas las DNA polimerasas requieren dNTPs para poder realizar la polimerización del DNA. Incorporan dNMPs a la secuencia, liberando una molécula de PPi (pirofosfato). Incluso, algunas como la Pol μ son capaces de incorporar NTPs con gran eficiencia (Ruíz *et al.*, 2003). Otra característica en común es la necesidad de un **molde**, que será el encargado de dirigir la polimerización. Esta cadena molde es copiada siguiendo las reglas de apareamiento de bases predichas por Watson y Crick. Gracias a este hallazgo, se obtuvo la base química de la replicación semiconservativa del DNA; además, fue el primer ejemplo del uso de un molde para guiar una reacción biosintética. Sin embargo, también existen DNA polimerasas capaces de realizar este proceso de polimerización en ausencia de molde, como las DNA polimerasas TdT y la Pol μ (Bollum, 1960; Domínguez *et al.*, 2000).

Las DNA polimerasas no pueden llevar a cabo la síntesis *de novo* de una cadena de DNA, sino que requieren la presencia de un **iniciador** o **primer** que aporte un grupo -OH al que poder empezar a añadir nucleótidos. Este *primer* puede ser un fragmento de DNA, RNA o una TP, la cual aporta el grupo -OH de un aminoácido específico (Ser, Thr o Tyr) (Salas, 1991). La **síntesis de DNA** es **direccional**; las DNA polimerasas catalizan la síntesis del DNA en sentido 5'-3'.

Finalmente, todas las DNA polimerasas requieren la presencia de un par de **iones metálicos divalentes**, preferentemente Mg^{2+} (Steitz *et al.*, 1994), que actúan como cofactores en la reacción de polimerización.

Aparte de estas propiedades comunes entre las DNA polimerasas, también se pueden definir diferencias funcionales. Algunas polimerasas tienen actividades enzimáticas adicionales a la polimerización, como actividad exonucleasa 3'-5', actividad exonucleasa 5'-3' (Kornberg y Baker, 1992; Lyamichev *et al.*, 1993), actividad RNasa H, actividad dRP-liasa (Saxowsky *et al.*, 2002; Sobol y Wilson, 2001), o actividad primasa, entre otras. Estas actividades pueden residir en dominios separados dentro del mismo polipéptido, o estar localizadas en subunidades separadas, pero firmemente asociadas entre sí.

1.4. Mecanismo de polimerización

Básicamente, las DNA polimerasas catalizan la incorporación de dNMPs a la cadena iniciadora del DNA dúplex atendiendo a su complementariedad con la base del dNMP localizado en la cadena molde (Kornberg y Baker, 1992). A pesar de la diversidad encontrada entre las DNA polimerasas, se ha podido establecer un mecanismo de acción común a todas ellas (Steitz *et al.*, 1994). Estas enzimas catalizan la síntesis de DNA a través de un mecanismo ordenado en el que tiene lugar, como primer paso, la unión a la enzima de una molécula sustrato de DNA de tipo iniciador/molde, resultando el complejo binario DNA polimerasa-DNA.

La parte dúplex del DNA se posiciona en un surco formado entre los subdominios *palm* y *thumb*. Este último establece múltiples contactos con el DNA, desencadenándose un cambio conformacional en la enzima gracias al cual la cadena de DNA queda rodeada por el *thumb*. Dicho subdominio establece la interacción necesaria con el esqueleto de fosfatos del DNA para formar un complejo estable DNA polimerasa/DNA. En la mayoría de las DNA polimerasas replicativas, este subdominio interacciona a su vez con un factor proteico que confiere una procesividad elevada al proceso de replicación. La incorporación del nucleótido en este complejo es iniciada por la unión de un dNTP al complejo enzima-sustrato para formar el complejo ternario DNA polimerasa-DNA-dNTP.

El subdominio *fingers* juega un papel fundamental en el correcto posicionamiento del dNTP en el centro activo de polimerización. Este subdominio contiene residuos conservados importantes en el establecimiento de interacciones con los fosfatos γ y β del nucleótido entrante, así como con el extremo de la cadena iniciadora y molde. En ausencia de nucleótidos, el subdominio *fingers* está en conformación abierta. Una vez unido el nucleótido, este subdominio rota un determinado número de grados, según la polimerasa, hacia el subdominio *palm*, cerrando de esta forma el centro activo y permitiendo la orientación adecuada de los sustratos y residuos requeridos para que tenga lugar la catálisis de la reacción. A diferencia del resto de familias, las DNA polimerasas de la familia Y poseen el subdominio *fingers* en conformación cerrada, independientemente de la unión del sustrato. El paso limitante en la polimerización es la conversión de este complejo ternario en un complejo activado competente para que tenga lugar la reacción química. En esta reacción intervienen dos iones metálicos divalentes (A y B) coordinados por dos residuos carboxílicos catalíticos conservados de manera invariable en los motivos A y C, tanto en DNA como RNA polimerasas. El metal A interacciona con el grupo -OH del extremo 3' de la cadena iniciadora desprotonándolo y permitiendo el ataque nucleofílico del oxanión resultante al fosfato α del dNTP entrante, dando lugar a la formación de un enlace fosfodiéster. El metal B interviene en la liberación del PPi generado tras la reacción. Ambos iones estabilizan la estructura y carga del estado de transición pentacovalente formado durante el transcurso de la reacción. Este mecanismo catalítico de dos iones metálicos parece estar universalmente conservado entre todas las familias de DNA y RNA polimerasas (Steitz *et al.*,

1994). En este punto, la enzima puede disociarse de la molécula sustrato (síntesis distributiva) o continuar unida a ella para localizar el nuevo extremo 3' en el centro activo de polimerización para una nueva ronda de incorporación (síntesis procesiva). Si la incorporación del nucleótido es errónea, el extremo de la cadena iniciadora puede ser dirigido al dominio exonucleasa 3'-5' (si está presente en la DNA polimerasa) con objeto de ser eliminado. Las DNA polimerasas presentan diferencias con respecto a sus propiedades de polimerización, lo que conlleva a una gran diferenciación funcional. Así, la eficiencia con la que insertan nucleótidos puede variar en un rango de más de 10^7 según la polimerasa (Beard *et al.*, 2002); la fidelidad de inserción de nucleótidos, desde un nucleótido erróneo de cada tres incorporados en Pol ϵ a 1 de cada 10^5 en DNA polimerasas replicativas como la del bacteriófago T7 (Bebenek *et al.*, 2001); el número de nucleótidos que alguna de estas enzimas es capaz de incorporar por suceso de unión al sustrato varía desde tan sólo uno como en el caso de algunas polimerasas de reparación y de TLS (Bebenek y Kunkel, 2004) a más de 70.000, como es el caso de DNA polimerasas replicativas como la del bacteriófago $\phi 29$ (Blanco *et al.*, 1989). Existen también diferencias con respecto a la preferencia de sustrato, desde el uso de DNA con *gaps* de un sólo nucleótido (Pol β) a la utilización preferente de un DNA dañado (Pol η) (McCulloch *et al.*, 2004). Como anteriormente se ha comentado, existen también polimerasas que no requieren la dirección de una cadena molde para la inserción de nucleótidos, como es el caso de la TdT (Bollum, 1960).

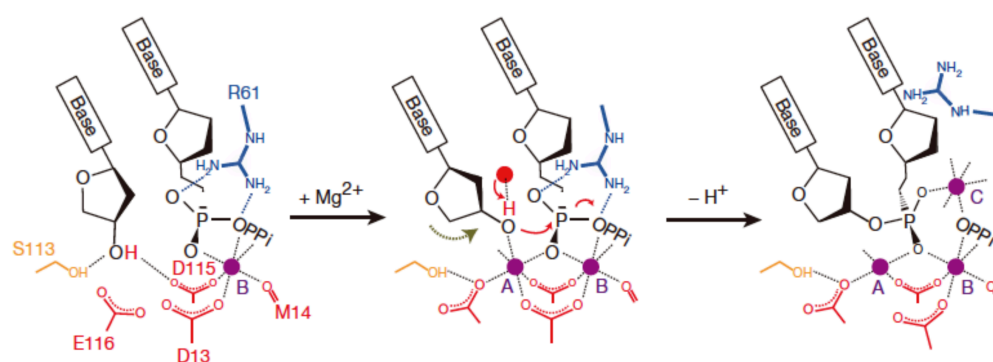


Figura 2: Mecanismo de polimerización dependiente de tres iones metálicos. En la figura se muestra el mecanismo de polimerización descrito para la DNA polimerasa η de la familia Y en el que participa un tercer metal catalítico (Tomado de Nakamura *et al.*, 2012).

Estudios cristalográficos recientes realizados en DNA polimerasas de la familia X e Y han demostrado la existencia de un tercer metal que es esencial en el mecanismo de polimerización (Freudenthal *et al.*, 2013; Nakamura *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2016) (Figura 2). Así, el tercer metal, que no está coordinado por ningún residuo de la polimerasa, lleva a cabo la ruptura del enlace entre el fosfato α y β del nucleótido entrante, promoviendo la transferencia del grupo fosforilo al extremo 3'-OH de la cadena iniciadora que se desprotona para la formación del nuevo enlace fosfodiéster (Yang *et al.*, 2016). Estudios estructurales y bioquímicos

realizados con DNA polimerasas de la familia B, como RB69 (Zakharova *et al.*, 2004), apoyan el papel de este tercer metal como una característica general del mecanismo de polimerización.

1.5. Fidelidad de síntesis y capacidad correctora de errores

Las DNA polimerasas han desarrollado mecanismos para asegurar la fidelidad de inserción estable durante la síntesis del DNA. Parte de estos mecanismos son la selección geométrica del par de bases nascente, la afinidad por el nucleótido, la extensión de desapareamiento y la actividad exonucleolítica correctora de errores (Kunkel y Bebenek, 2000).

El centro activo de polimerización, cuando alcanza una conformación cerrada (catalíticamente activa), sólo puede albergar espacialmente una estructura del par de bases nascente que siga las reglas del apareamiento tipo Watson-Crick, rechazando los apareamientos erróneos (Kunkel y Bebenek, 2000). Esto se debe a los cambios conformacionales que producen el par de bases no complementarios, ya que el centro activo de polimerización no adquiere una conformación catalíticamente activa debido a que el subdominio *fingers* no puede pasar a la conformación "cerrada". Esto a su vez afecta negativamente la estabilización del extremo del *primer* en el centro activo de polimerización, disminuyendo la velocidad de síntesis del DNA hasta 10^4 veces (Johnson y Beese, 2004). Esta parada en la polimerización permite al extremo 3' de la cadena iniciadora moverse hacia el centro activo exonucleasa 3'-5', dirigido por residuos del subdominio *thumb* (Franklin *et al.*, 2001; Shamooy y Steitz, 1999). Una vez escindido el nucleótido incorrecto del extremo 3' de la cadena iniciadora, ésta regresa al centro activo de polimerización para ser elongada (Franklin *et al.*, 2001). El equilibrio entre extensión y escisión del error incorporado es determinante para la fidelidad de síntesis, por lo que se requiere una adecuada coordinación entre ambas actividades (Kunkel y Bebenek, 2000; Wong *et al.*, 1991). Estudios *in vitro* han demostrado que la actividad exonucleasa correctora de errores mejora la fidelidad de la replicación (Bebenek y Kunkel, 1995). También se ha descrito la existencia de proteínas accesorias que pueden modular la fidelidad de síntesis del DNA (Bebenek *et al.*, 2002). Además, algunos daños pueden ser tolerados gracias a la acción de polimerasas que actúan en la síntesis del DNA a través de lesiones (Friedberg *et al.*, 2002; Goodman, 2002).

2. LA REPLICACIÓN DEL DNA

La viabilidad de un organismo depende de la correcta replicación de su genoma, proceso que llevan a cabo las DNA polimerasas replicativas. En general, la replicación del DNA comienza en regiones internas de la molécula, conocidas como orígenes de replicación. Una serie de proteínas de unión a estas secuencias específicas de DNA reconocen y abren parcialmente la doble hélice, permitiendo la entrada de una proteína helicasa, necesaria para extender la desnaturalización local del DNA a medida que avanza la horquilla de replicación. El DNA de cadena sencilla originado es recubierto por proteínas de unión a DNA de banda simple (SSBs)

con objeto de protegerlo de la acción de posibles nucleasas y evitar la formación de estructuras secundarias que pudieran impedir el paso de la horquilla de replicación. En esta “burbuja” de replicación se ensamblarán el resto de proteínas que conforman el replisoma (ver Figura 3).

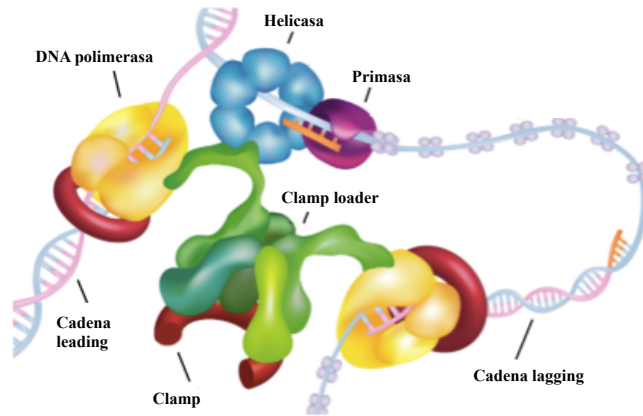


Figura 3. Componentes del replisoma durante la polimerización. La DNA polimerasa de la cadena *leading* sintetiza el DNA de manera continua mientras que la DNA polimerasa de la cadena *lagging* sintetiza los llamados fragmentos de Okazaki. El *clamp-loader* se une al factor de procesividad (*clamp*) y a ambas polimerasas. La *helicasa* produce la apertura de la doble hélice de DNA para que la horquilla de replicación pueda avanzar; además, recluta a la *primasa* a la horquilla de replicación para iniciar la síntesis de un nuevo fragmento (adaptado de Langston y O'Donnell, 2006).

Debido, por una parte, a que las DNA polimerasas sólo sintetizan en dirección 5'-3' y, por otra, al hecho de ser las dos cadenas antiparalelas, la síntesis de la doble hélice ha de llevarse a cabo de forma coordinada (Kornberg y Baker, 1992; McHenry, 2003); una de las dos cadenas del DNA se sintetiza de modo continuo (cadena avanzada o *leading*), mientras que la otra es copiada discontinuamente (retrasada o *lagging*) en fragmentos de hasta 1.000 nucleótidos (fragmentos de Okazaki). Al ser las DNA polimerasas incapaces de iniciar la polimerización por sí mismas, otra proteína, la primasa, sintetiza cadenas cortas de RNA (una para comenzar la cadena de síntesis continua, y una por cada fragmento de Okazaki en la discontinua), que serán posteriormente elongadas por la DNA polimerasa. Para coordinar la replicación de ambas cadenas, en la horquilla de replicación tienen que intervenir varias moléculas de DNA polimerasa. En *E. coli*, la acción coordinada de las polimerasas está posibilitada por la unión física de las mismas en un gran complejo multiprotéico llamado holoenzima DNA pol III, que incluye dos copias de la DNA pol III unidas a una copia del complejo γ (constituido por 5 subunidades proteicas). Conforme la helicasa “abre” el DNA en la horquilla de replicación, la cadena avanzada es copiada de manera continua, mientras que la cadena retrasada lo es de manera discontinua. Cuando la polimerasa completa un fragmento de Okazaki, la DNA polimerasa se disocia del DNA, pero permanece asociada al holoenzima, volviéndose a unir al 3'-OH de otro

primer para la síntesis de un nuevo fragmento de Okazaki (Glover y McHenry, 2001).

En eucariotas, la horquilla de replicación requiere la intervención de tres DNA polimerasas diferentes: DNA pol α /primasa, DNA pol δ y ϵ . La DNA polimerasa α /primasa lleva a cabo la iniciación de la síntesis de DNA, mientras que Pol δ y ϵ continúan la elongación de las cadenas *lagging* y *leader*, respectivamente.

3. MECANISMO DE REPLICACIÓN INICIADA POR PROTEÍNA TERMINAL

3.1. Replicación del genoma del bacteriófago $\phi 29$

El genoma del bacteriófago $\phi 29$ es un dsDNA lineal de 19.285 pares de bases (pb) (Paces *et al.*, 1986), en cuyos extremos 5' se encuentra unida covalentemente una TP (Salas *et al.*, 1978). La replicación en este virus requiere la formación previa de un heterodímero entre la DNA polimerasa y una molécula de TP libre (Blanco *et al.*, 1987). Este complejo reconoce los orígenes de replicación que se hallan en los extremos de la molécula de DNA, caracterizados por la presencia de una secuencia repetida de 6 pb (3'-TTTCAT-5') (Salas, 1991). Durante la iniciación, la DNA polimerasa cataliza en ambos extremos la adición de una molécula de dAMP al grupo hidroxilo de la Ser232 de la TP (Blanco *et al.*, 1984; Hermoso *et al.*, 1985), empleando como base molde el segundo dTMP de la cadena (Méndez *et al.*, 1992). Seguidamente, con objeto de recuperar la primera posición de la cadena que está siendo empleada como molde, y gracias a la reiteración de secuencia en los extremos del genoma, el complejo se desliza una posición hacia atrás (*sliding-back*), quedando el primer nucleótido incorporado enfrente al dTMP 3' terminal de la cadena molde (Méndez *et al.*, 1992). A continuación, esta misma molécula de polimerasa lleva a cabo la elongación del DNA (Blanco y Salas, 1985b). A partir de la incorporación del sexto dNMP, la DNA polimerasa y la TP experimentan una serie de cambios conformacionales, etapa de transición (Méndez *et al.*, 1997), que desencadenarán la disociación del heterodímero a partir de la incorporación del décimo dNMP, quedando la TP unida covalentemente al extremo 5' de la cadena naciente del DNA. A partir de ese momento, la DNA polimerasa lleva a cabo la síntesis completa de la molécula de manera procesiva y acoplada al desplazamiento de la cadena que no está siendo copiada (Blanco *et al.*, 1989). Cuando las dos horquillas de replicación se encuentran, las dos cadenas parentales parcialmente replicadas se separan y la síntesis del genoma se completa (ver Figura 4).

Otros factores necesarios para la replicación del genoma de $\phi 29$ son las proteínas virales SSB y de unión a DNA de banda doble (DBP). La primera se une a la cadena sencilla que está siendo desplazada en el proceso de replicación, evitando de esta forma la acción de las nucleasas (Martín *et al.*, 1989), así como la formación de estructuras secundarias (Soengas *et al.*, 1995). La DBP de $\phi 29$ se une a los extremos del genoma del fago formando un complejo nucleoprotéico que favorece la apertura de los extremos del DNA para la iniciación de la replicación (Blanco *et al.*, 1986; Gutiérrez *et al.*, 1986; Serrano *et al.*, 1989). Por otra parte, existen dos proteínas virales,

p1 y p16.7, que están unidas a la membrana bacteriana e interaccionan con la molécula de TP-DNA. Este hecho sugiere que ambas proteínas son responsables de la asociación de la replicación del DNA del bacteriófago a la membrana bacteriana, probablemente facilitando la unión a ésta del complejo de replicación (Bravo y Salas, 1997; Meijer *et al.*, 2001).

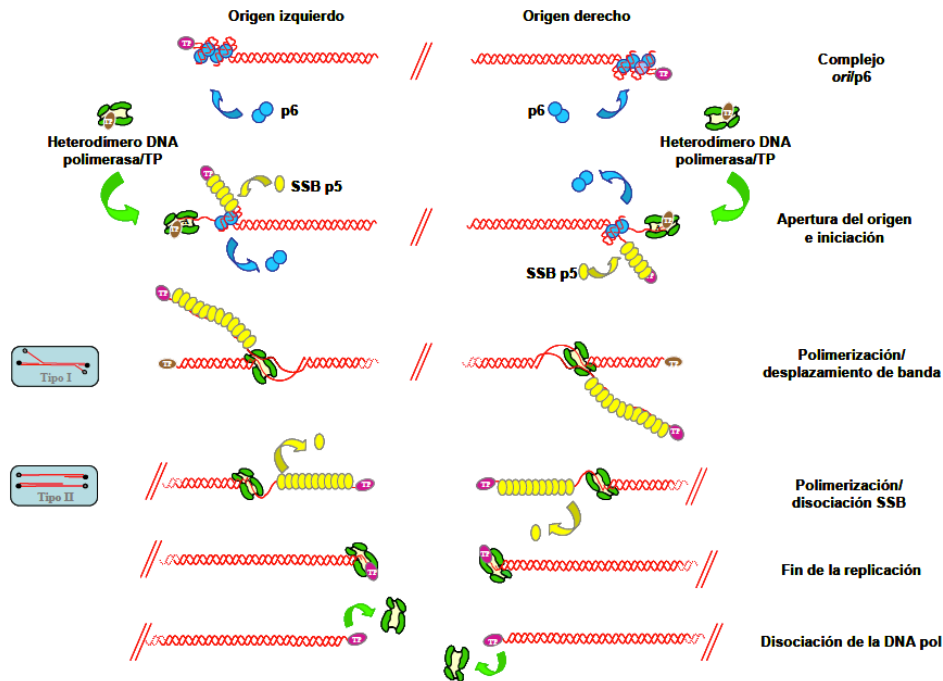


Figura 4: Representación esquemática de la replicación del genoma de $\phi 29$. Modelo de la replicación del DNA de $\phi 29$. La TP parental y libre están representadas en rosa y ocre, respectivamente, la DNA polimerasa en verde, la DBP en azul y la SSB en amarillo.

3.2. Características funcionales de la DNA polimerasa de $\phi 29$

La enzimología de la replicación del DNA del bacteriófago $\phi 29$ se basa principalmente en las múltiples actividades catalíticas y en las propiedades peculiares del producto del gen 2 del fago, la DNA polimerasa (Blanco *et al.*, 1984).

La DNA polimerasa del bacteriófago $\phi 29$ es una enzima monomérica de 66 kDa perteneciente a la familia B de DNA polimerasas dependientes de DNA (Blanco *et al.*, 1987), y dentro de ésta, al subgrupo de aquellas que inician la replicación a partir de una TP. Posee actividad polimerasa y exonucleasa 3'-5' (Blanco *et al.*, 1984; Blanco y Salas, 1985a), cada una de ellas localizada en un dominio estructuralmente independiente (Blanco y Salas, 1995b; Blanco y Salas, 1996) (ver Figura 4). Su actividad de polimerización presenta unos valores de discriminación en la inserción de nucleótido de 10^4 - 10^6 y una eficiencia de elongación de desapareamientos de 10^5 - 10^6 veces menor que la de un extremo correctamente apareado (Esteban *et al.*, 1993). Esta enzima cataliza tanto la iniciación a partir de una TP (Peñalva y Salas, 1982) como la elongación posterior de la cadena de DNA que ha de ser sintetizada (Blanco y Salas, 1995). La DNA polimerasa de $\phi 29$ posee dos actividades de degradación sobre DNA, la

anteriormente mencionada actividad exonucleasa 3'-5' y la pirofosforolisis (Blasco *et al.*, 1991). La pirofosforolisis es la reacción inversa a la de inserción de nucleótido. Consiste en la liberación de dNTPs del extremo 3' de una estructura molde/iniciador como consecuencia de la adición de PPi en presencia de iones divalentes, posiblemente jugando un papel en la fidelidad (Blasco *et al.*, 1991) como se ha demostrado para otras DNA polimerasas como Pol λ (Crespan *et al.*, 2011). Los mutantes de la DNA polimerasa en los residuos catalíticos de polimerización están también afectados en la pirofosforolisis indicando que ambas actividades se localizan en el mismo centro activo (Blasco *et al.*, 1991). La actividad exonucleasa 3'-5' correctora de errores se encuentra en la misma cadena polipeptídica que la actividad de polimerización, aunque como en la mayoría de las replicasas las actividades de polimerización y exonucleolisis de la DNA polimerasa de ϕ 29 están presentes en dominios estructuralmente independientes (Blanco y Salas, 1995; Kamtekar *et al.*, 2004). Esta actividad requiere iones divalentes para liberar dNMPs del extremo 3' de una cadena de DNA (Blanco y Salas, 1985a) y juega un papel importante en la fidelidad ya que corrige errores incorporados durante la replicación del DNA, degradando preferentemente extremos desapareados frente a extremos apareados (Garmendia *et al.*, 1992). Esta actividad degrada procesivamente (sin disociarse del DNA) sustratos mayores de 6 nucleótidos con una constante catalítica de 500 s^{-1} y distributivamente sustratos de menor longitud (Esteban *et al.*, 1994).

Como características distintivas frente al resto de DNA polimerasas, la DNA polimerasa de ϕ 29 lleva a cabo la replicación completa de su genoma de forma procesiva (permanece unida al sustrato) y acoplada al desplazamiento de la cadena de DNA que no está siendo empleada como molde (Blanco *et al.*, 1989). Todo ello sin la intervención de proteínas accesorias de tipo *sliding-clamp* o helicasa, presentes habitualmente en el resto de sistemas de replicación. Estas características han sido la base para el desarrollo de sistemas de amplificación isotérmica de DNA basados en la DNA polimerasa de ϕ 29 (Dean *et al.*, 2001).

3.3. Estructura de la DNA polimerasa de ϕ 29

Como se puede ver en la Figura 5, la resolución de la estructura cristalográfica de la DNA polimerasa de ϕ 29 (Kamtekar *et al.*, 2004) muestra un plegamiento bimodular muy similar al mostrado por otras DNA polimerasas de la familia B cristalizadas hasta la fecha, consistente en un dominio N-terminal que contiene la actividad exonucleasa 3'-5' (residuos 1-189), y un dominio C-terminal de polimerización (residuos 190-575). La separación entre los centros activos de polimerización y exonucleolisis ($30\text{-}40 \text{ \AA}$) permite una perfecta coordinación entre ambas actividades, conectadas estructural y funcionalmente por el motivo YxG(G/A), conservado en las DNA polimerasas de tipo eucariótico e implicado en la unión del DNA y de la TP (Truniger *et al.*, 1996).

El dominio exonucleasa de la DNA polimerasa de $\phi 29$, evolutivamente conservado en las DNA polimerasas de las familias A, B y C (Bernad *et al.*, 1989), confirma las comparaciones de secuencias y los estudios mutacionales anteriores que indicaban que los residuos catalíticos son el Asp12 y el Glu14 del motivo Exo I, el Asp66 del motivo Exo II y el Asp169 del motivo Exo III (Bernad *et al.*, 1989; Soengas *et al.*, 1992). Del mismo modo, corroboró el papel auxiliar en catálisis de los residuos Tyr165 (del motivo Exo III) (Esteban *et al.*, 1994; Soengas *et al.*, 1992) y Lys143 (perteneciente al motivo Kx₂h) (de Vega *et al.*, 1997). La estructura de la DNA polimerasa de $\phi 29$ unida a un oligonucleótido de 5 mer muestra cómo el dominio exonucleasa contacta sólo con los últimos 3 nucleótidos del extremo 3' del DNA, permitiendo corroborar el papel propuesto para los residuos Thr15, Asn62 y Phe65 en la estabilización del DNA de banda simple en el centro activo de exonucleolisis (de Vega *et al.*, 1996; de Vega *et al.*, 1998b).

El dominio de polimerización presenta los subdominios universalmente conservados *palm*, *fingers* y *thumb*. La estructura del complejo ternario de la DNA polimerasa de $\phi 29$ (Berman *et al.*, 2007) confirma en el subdominio *palm* los residuos Asp249 y Asp458 como los aminoácidos encargados de coordinar los metales catalíticos (Bernad *et al.*, 1990; Blasco *et al.*, 1993a), así como muestra un tercer residuo también implicado en esta coordinación, la Val250 (Pérez-Arnaiz *et al.*, 2010).

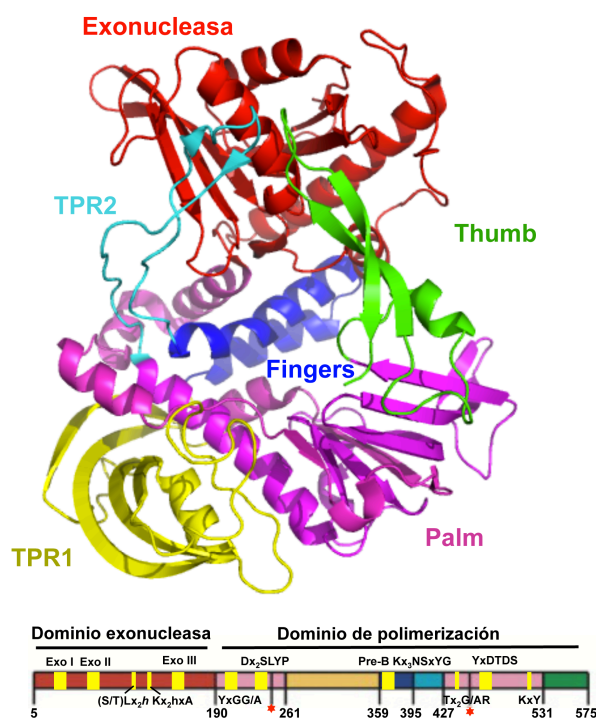


Figura 5: Estructura tridimensional de la DNA polimerasa de $\phi 29$. El dominio exonucleasa se representa en rojo, el *thumb* en verde, el *palm* en rosa, los *fingers* en azul oscuro y los subdominios TPR1 y TPR2 en amarillo y azul claro respectivamente, como aparecen representados en Kamtekar *et al.* (2004). En la parte inferior se muestra la estructura primaria de la DNA polimerasa con los distintos dominios y subdominios, así como los motivos conservados. Los datos cristalográficos corresponden al PDB 2EX3.

El subdominio *fingers*, al igual que en otras DNA polimerasas de la familia B, está formado por dos hélices- α antiparalelas y se encuentra en conformación abierta en ausencia de dNTP y en conformación cerrada en presencia de éste (Berman *et al.*, 2007). Se confirma el papel

de los residuos Lys379 y Lys383, pertenecientes al motivo B (conservado en las DNA polimerasas dependientes de DNA), en la interacción con el fosfato γ en el caso del primero y con los fosfatos α y γ del dNTP en el caso del segundo (Saturno *et al.*, 1997; Truniger *et al.*, 2004b), así como el del residuo Lys371 del motivo pre-B en su interacción con el fosfato γ (Truniger *et al.*, 2002).

También se han identificado otros dos residuos, Tyr390 (motivo B) (Blasco *et al.*, 1992; Saturno *et al.*, 1995) y Tyr254 (Dx₂SLYP) (Blasco *et al.*, 1992; Bonnin *et al.*, 1999; Saturno *et al.*, 1995), que cambian su posición si comparamos los complejos binario y ternario de la DNA polimerasa, pasando de ocupar el sitio de inserción del dNTP en el complejo binario a abandonarlo para permitir la unión de éste, formando parte del bolsillo hidrofóbico para el par de bases nascente en el complejo ternario (Berman *et al.*, 2007). Dicho movimiento se ha propuesto como el responsable de la translocación de la DNA polimerasa a lo largo del DNA. Además, la Tyr254 es la encargada de discriminar contra el grupo 2'-OH de los ribonucleótidos (Bonnin *et al.*, 1999).

El subdominio *thumb* es pequeño y presenta una estructura inusual formada por un elemento β -giro- β (β -hairpin), mientras que en otras DNA polimerasas este subdominio presenta un carácter básicamente helicoidal.

La principal diferencia entre la DNA polimerasa de ϕ 29 y otras de la familia B es la presencia de dos subdominios, ambos correspondientes a inserciones de secuencia conservadas en el subgrupo de las DNA polimerasas que utilizan una proteína como iniciador, llamados Terminal Protein Region (TPR) 1 y 2 (Blasco *et al.*, 1990; Dufour *et al.*, 2000). El subdominio TPR1 se encuentra situado junto al *palm* y contacta con el dsDNA y con la TP (Berman *et al.*, 2007; Kamtekar *et al.*, 2006), confirmando el papel que le fue adjudicado previamente como ligando de ambos (Dufour *et al.*, 2000; Dufour *et al.*, 2003).

El subdominio TPR2, con una estructura también de β -hairpin, forma, junto a los subdominios *thumb*, *palm* y TPR1, una estructura anular que rodearía por completo al DNA *upstream*, estabilizando la unión de la DNA polimerasa al sustrato requerida para llevar a cabo la replicación de manera procesiva (Berman *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2005). Asimismo, el subdominio TPR2 participa, junto con los subdominios *fingers*, *palm* y el dominio exonucleasa, en la formación de un canal estrecho por el que pasa la cadena molde para acceder al centro activo de polimerización durante la replicación, forzando la separación de las dos cadenas del dsDNA (Kamtekar *et al.*, 2004), actuando de manera análoga a como lo haría una helicasa y proporcionando a la polimerasa su capacidad de acoplar la polimerización al desplazamiento de banda (Berman *et al.*, 2007; Kamtekar *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2005).

3.4. Estructura del heterodímero formado por la DNA polimerasa y la proteína terminal de $\phi 29$

En la estructura cristalográfica del heterodímero DNA polimerasa/TP (Kamtekar *et al.*, 2006) (Figura 6) se puede observar cómo la TP se encuentra plegada en tres dominios: el dominio N-terminal (residuos 1-73), el cual no interacciona con la DNA polimerasa; el dominio intermedio (residuos 74-172), formado principalmente por dos hélices- α , que interacciona con la región TPR1 de la DNA polimerasa y está conectado por una región flexible al dominio iniciador (residuos 173-266), compuesto por cuatro hélices- α de fuerte carácter electronegativo y que se sitúa ocupando el túnel de unión de DNA anteriormente mencionado y formado por los subdominios *palm*, *thumb* y TPR2, estableciendo múltiples contactos con la DNA polimerasa. La Ser232 de la TP, que proporciona el grupo –OH iniciador para la síntesis del DNA, se encuentra en un *loop* al final del dominio iniciador, situándose en el centro activo de polimerización de la DNA polimerasa. Este dominio debe abandonar dicho centro activo a medida que el nuevo DNA es sintetizado manteniéndose la interacción DNA polimerasa/TP a través de otros contactos durante la adición de los primeros 8-9 nucleótidos. Tras la incorporación del décimo nucleótido, la DNA polimerasa se disocia de la TP para continuar con la polimerización (Kamtekar *et al.*, 2006; Méndez *et al.*, 1997).

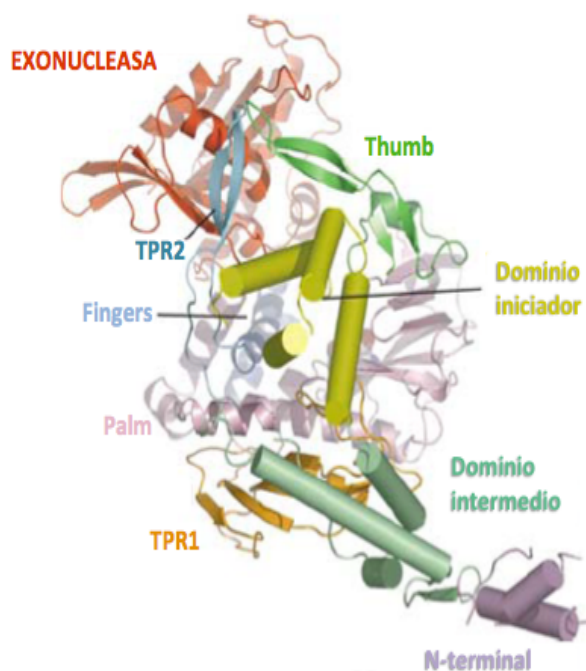


Figura 6. Estructura del heterodímero polimerasa-proteína terminal. Representación en bandas de la DNA polimerasa de $\phi 29$ interaccionando con la TP representada con helices cilíndricas (Kamtekar *et al.*, 2006).

La conformación de la DNA polimerasa de $\phi 29$ formando un complejo con la TP es muy similar a la de la apoenzima; la principal diferencia estructural está restringida a los residuos 304-

315 del subdominio TPR1. Estos residuos forman un *loop* con un alto grado de flexibilidad en el apoenzima y que, por el contrario, se encuentra plegado hacia fuera en el heterodímero, permitiendo el acceso del dominio iniciador de la TP al centro activo de la DNA polimerasa (ver más adelante).

OBJETIVOS

Los estudios cristalográficos del complejo ternario de la DNA polimerasa de $\phi 29$ mostraron que los iones metálicos A y B del centro activo de polimerización están coordinados no solo por los fosfatos a y g del nucleótido entrante y por los residuos catalíticos Asp249 (motivo A) y Asp458 (motivo C), sino también por el grupo carbonilo de la Val250 (motivo A), que se encuentra altamente conservado en el subgrupo de las DNA polimerasas que inician con Proteína Terminal. Además, alineamientos múltiples de secuencia permitieron identificar un residuo de Glu conservado (correspondiente al Glu486 en la DNA polimerasa de $\phi 29$) situado en el centro activo de polimerización de las DNA polimerasas de tipo eucariótico. Este residuo ya había sido previamente propuesto como un nuevo ligando indirecto de un ión metálico no catalítico en la DNA polimerasa del bacteriófago RB69, y forma parte del denominado motivo LExE.

Por otro lado, estudios realizados con anterioridad en el subdominio TRP1 de la DNA polimerasa de $\phi 29$ pusieron de manifiesto su importancia en la interacción tanto con la TP como con el DNA. Los estudios cristalográficos del heterodímero DNA polimerasa/TP de $\phi 29$ permitieron observar un loop flexible perteneciente al subdominio TPR1 y situado en la entrada del surco de unión de los sustratos en la DNA polimerasa.

Para evaluar la potencial relevancia funcional de los residuos pertenecientes tanto al motivo LExE como al *loop* del subdominio TPR1 se establecieron los siguientes objetivos:

1. Determinación del papel funcional del residuo Glu486 perteneciente al motivo LExE de la DNA polimerasa de $\phi 29$ y homólogo al Glu686 de la DNA polimerasa de RB69 como potencial ligando de un tercer ión metálico en el centro activo de polimerización mediante el análisis bioquímico de derivados mutantes en esa posición.
2. Análisis y determinación funcional de los residuos Gly481, Trp483 y Ala484 localizados en el motivo LExE de la DNA polimerasa de $\phi 29$ en la interacción con el nucleótido entrante.
3. Determinación de la función del *loop* perteneciente al subdominio TPR1 en la estabilización de los sustratos de la DNA polimerasa de $\phi 29$, DNA y TP, mediante el análisis bioquímico de mutantes puntuales en los residuos Arg306, Arg308, Phe309, Tyr310 y Lys311, así como de un mutante de delección carente de dicho *loop*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Nucleótidos

Los nucleótidos no marcados radiactivamente, así como el [α - 32 P]dATP (3000 Ci/mmol) y el [γ - 32 P]ATP (3000 Ci/mmol) fueron suministrados por Amersham Biosciences.

1.2. Proteínas

La polinucleótido quinasa de T4 se obtuvo de New England Biolabs.

La DNA polimerasa *wild-type* del bacteriófago ϕ 29 así como el mutante deficiente en actividad exonucleasa (D12A/D66A) (Bernad *et al.*, 1989) se purificaron a partir de células de *E. coli* BL21(DE3) que portaban el plásmido pJLPM (derivado del pT7-4w2 en el caso de la *wild-type* o del pT7-3 en el caso de la proteína deficiente en actividad exonucleasa) (Lázaro *et al.*, 1995).

La TP *wild-type* del bacteriófago ϕ 29 se purificó como se describe en Mencía *et al.* (2011), a partir de células de *E. coli* BL21(DE3) que contiene el gen 3 clonado en el plásmido pT7-3.

1.3. Sustratos de DNA

Todos los oligonucleótidos fueron obtenidos de Isogen y purificados mediante geles de poliacrilamida al 20%-7 M urea. Los oligonucleótidos sp1 (5'- GATCACAGTGAGTAC) y sp1p (5'- GATCACAGTGAGTAG) fueron marcados radiactivamente en el extremo 5' con [γ - 32 P]dATP mediante la enzima polinucleótido quinasa del fago T4. El oligonucleótido sp1 marcado se usó como sustrato ssDNA en ensayos de exonucleolisis. Las moléculas de tipo iniciador/molde utilizadas en esta tesis se obtuvieron mediante la hibridación de los oligonucleótidos sp1 y sp1p al oligonucleótido sp1c+6 (5'- TCTATTGTACTCACTGTGATC) o, en el caso de sp1 también al oligonucleótido sp1c+6A (5'- TCTATAGTACTCACTGTGATC), en presencia de 0,2 M NaCl y 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, para generar moléculas de tipo iniciador/molde usada en ensayos que requieren como sustrato un dsDNA con un extremo protuberante de 6 nucleótidos.

El DNA de ϕ 29 fue obtenido por tratamiento de las partículas víricas con proteinasa K en presencia de SDS (Inciarte *et al.*, 1976), posterior extracción con fenol y precipitación con etanol.

El genoma del bacteriófago ϕ 29 (TP-DNA) fue obtenido como se describe en Peñalva y Salas (1982).

El ssDNA de M13mp18 fue hibridado al oligonucleótido universal de 17mer de longitud en presencia de 0,2 M NaCl y 60 mM Tris-HCl, pH 7,5, para obtener una molécula de DNA

iniciador/molde usada para el análisis de la síntesis procesiva acoplada al desplazamiento de banda.

El 5'-*p*-nitrofenil éster de timidina monofosfato (*p*NP-TMP) fue adquirido de Sigma.

2. MÉTODOS

2.1. Mutagénesis dirigida, expresión y purificación de las DNA polimerasas mutantes

Para la obtención de las DNA polimerasas mutantes de $\phi 29$ se empleó el *kit* de mutagénesis dirigida QuickChange de Amersham Pharmacia. Como molde para la reacción de mutagénesis se utilizaron tanto el plásmido pJLPM, que contiene el gen *wild-type* de la DNA polimerasa del bacteriófago $\phi 29$, como el plásmido pT7-3 que contiene el gen mutante D12A/D66A de la DNA polimerasa que carece de la actividad exonucleasa 3'-5'. Se diseñaron oligonucleótidos complementarios a la secuencia del plásmido, que hibridan con éste flanqueando ambos lados de la región que contiene la mutación. Tras el ciclo térmico se trató con la endonucleasa *DpnI*. El DNA recién sintetizado se transformó en células competentes *E. coli* XL1-blue. Para asegurarnos que sólo estuviera presente la mutación deseada se secuenció el gen completo. La expresión de las proteínas mutantes se llevó a cabo en células *E. coli* BL21(DE3), que contiene el gen de la RNA polimerasa de T7 bajo el control del promotor *lacUV5*, inducible por IPTG (Studier y Moffatt, 1986). Las DNA polimerasas se purificaron como se ha descrito en Lázaro *et al.* (1995).

2.2. Balance de las actividades de polimerización y exonucleólisis 3' - 5'

La molécula híbrida sp1/sp1c+6 es del tipo iniciador/molde, ya que presenta un extremo 5' protuberante de 6mer de longitud el cual sirve de sustrato tanto para la actividad exonucleasa 3'-5' como para la actividad de polimerización dependiente de DNA. La mezcla de incubación contiene, en un volumen final de 12,5 μ l, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM DTT, 4% (v/v) glicerol, 0,1 mg/ml BSA, 10 mM MgCl₂ o 1 mM MnCl₂ según se indique, 30 nM DNA polimerasa *wild-type* o mutante. La proteína se incubó con 1,2 nM del sustrato sp1/sp1c+6, marcado en el extremo 5', con concentraciones crecientes de dNTPs. Tras 5 minutos de incubación a 25 °C, se paró la reacción añadiendo EDTA a una concentración final de 10 mM. Las muestras se analizaron por electroforesis en geles del 20% poliacrilamida-7M urea y posterior autorradiografía. Las actividades de polimerización y exonucleasa se determinaron por el aumento o disminución, respectivamente, de la longitud inicial del sustrato original (15mer).

2.3. Ensayo de la actividad Exonucleasa 3' - 5'

2.3.1. Actividad exonucleasa 3' - 5' sobre DNA

La mezcla de incubación contiene, en un volumen final de 12,5 μ l, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM DTT, 4% (v/v) glicerol, 0,1 mg/ml BSA, 10 mM MgCl₂ o 1 mM MnCl₂ según se

indique. Como sustrato de ssDNA se utilizaron 1,2 nM del oligonucleótido de 4mer o 1,2 nM del oligonucleótido sp1 (15mer), ambos marcados en el extremo 5'. Como sustrato de dsDNA se utilizó 1,2 nM del híbrido sp1/sp1c+6. La cantidad de proteína se ajustó en cada caso para conseguir condiciones lineales de reacción. Las muestras se incubaron a 25 °C durante los tiempos indicados y se paró la reacción añadiendo 10 mM de EDTA. Las muestras se analizaron por electroforesis en geles del 20% poliacrilamida-7M urea y posterior autorradiografía. La cuantificación fue realizada mediante densitometría de las bandas obtenidas. La degradación total se obtuvo calculando el número de eventos catalíticos que dieron lugar a los diferentes productos de degradación. A partir de estos datos se calcula la eficiencia catalítica de cada polimerasa mutante y se relativiza a la de la proteína *wild-type*.

2.3.2. Hidrólisis del 5'-*p*-nitrofenil éster de timidina 5'-monofato (*p*NP-TMP)

Las incubaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 300 µl que contenía 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM MnCl₂, 3 mM *p*NP-TMP (disuelto en 50 mM Tris-HCl, pH 8, y 150 mM NaCl) y 17 µM de cada DNA polimerasa, *wild-type* o mutante. La hidrólisis se analizó monitorizando la producción de *p*-nitrofenol a una longitud de onda de 420 nm con un espectrofotómetro Hitachi U-2000 a 25 °C, a los tiempos indicados (Hamdan *et al.*, 2002).

2.4. Ensayo de interacción de la DNA polimerasa con sustratos de DNA

Para analizar la interacción que establece la DNA polimerasa con los diferentes sustratos de DNA se llevaron a cabo ensayos de retraso en gel. Las reacciones se hicieron en un volumen de 20 µl que contenía 12 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 20 mM sulfato amónico, 0,1 mg/ml BSA, 1,2 nM de sp1/sp1c+6 o sp1p/sp1c+6 (en presencia de 10 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂ o sin metal según se indique) y las cantidades indicadas de DNA polimerasa *wild-type* o mutante. Tras incubar 5 minutos a 4 °C, las muestras se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida (80:1 monómero:bis) al 4% (p/v) que contenía 12 mM Tris-acetato, pH 7,5. La electroforesis se llevó a cabo a 4°C y en el mismo tampón a 8V/cm (Carthew *et al.*, 1985). Los complejos DNA polimerasa/DNA se detectaron por autorradiografía como un retraso en la movilidad del sustrato marcado.

2.5. Transferencia del *primer* desde el centro activo de polimerización al centro activo de exonucleolisis.

La mezcla de incubación contenía, en 12,5 µl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA, 4% (v/v) glicerol, 62 pM [α -³²P]dATP, 1,2 nM del sustrato híbrido no marcado sp1/sp1c+6 y 24 nM de cada una de las DNA polimerasas, *wild-type* o mutantes en sus dos formas, con y sin actividad exonucleasa. Las muestras fueron incubadas durante 10 min a 4 °C para permitir la formación del complejo DNA polimerasa/DNA. La reacción se inició con 10

mM MgCl₂ y 70 nM del ssDNA M13 como DNA competidor y la mezcla se incubó durante los tiempos indicados a 30 °C. Se llevaron controles de forma paralela a las reacciones anteriores en las que el DNA competidor se encuentra en la mezcla de reacción junto con el sustrato sp1/sp1c+6 antes de añadir la DNA polimerasa. Estas reacciones también se preincubaron durante 10 min, se iniciaron con 10 mM MgCl₂ y se incubaron los tiempos indicados a 30 °C. Todas las reacciones se pararon con 10 mM EDTA. Los productos de polimerización fueron analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida 20%-7 M urea y posterior autorradiografía. Para analizar la escisión de dAMP, 1 µl de cada muestra fue separada tras la incubación y analizada por cromatografía en capa fina (Polygram Cel 300 PEI/UV254) y posterior autorradiografía. La cromatografía se desarrolló en 0,15 M formiato de litio (pH 3,0); en estas condiciones el 5'-dAMP migra, mientras el sustrato de DNA y el dATP marcado permanecen en el punto de origen.

2.6. Transferencia del extremo 3' del *primer* desde el centro activo de exonucleolisis 3'-5' al centro activo de polimerización.

La mezcla de incubación contenía, en 12,5 µl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA, 4% (v/v) glicerol, 1,2 nM del sustrato híbrido marcado en 5' sp1/sp1c+6 y 24 nM de cada una de las DNA polimerasas, *wild-type* o mutantes en sus dos formas, con y sin actividad exonucleasa, y 8 µM de dNTPs. Las muestras fueron incubadas durante 10 min a 4 °C para permitir la formación del complejo DNA polimerasa/DNA. Las reacciones fueron iniciadas añadiendo de manera simultánea 10 mM MgCl₂ y 16 µM del sustrato competidor sp1p/sp1c+6 sin marcar y se incubaron durante 2 min a 30 °C. Como control de la efectividad del sustrato de DNA competidor, cada DNA polimerasa se incubó simultáneamente con las cantidades indicadas del sustrato marcado y el no marcado durante 10 min a 4 °C. Esta reacción se inició añadiendo 10 mM MgCl₂ y posterior incubación durante 2 min a 30 °C. Todas las reacciones se detuvieron con 10 mM EDTA y se analizaron por electroforesis en geles del 20% poliacrilamida-7M urea y posterior autorradiografía.

2.7. Ensayo de fidelidad de inserción de nucleótidos

La mezcla de incubación contenía, en un volumen final de 12,5 µl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM DTT, 4% (v/v) glicerol, 0,1 mg/ml BSA, 10 mM MgCl₂ o 1 mM MnCl₂ según se indique, 1,2 nM de la molécula híbrida marcada en 5' sp1/sp1c+6A como sustrato y las concentraciones indicadas de nucleótido correcto (dTTP) o incorrecto (dCTP). La cantidad de enzima fue ajustada para cada polimerasa con objeto de optimizar el producto de reacción asegurando que ésta se lleve a cabo en estado-estacionario. El cálculo de la *K_m* aparente para el nucleótido correcto dTTP en presencia de 1 mM de MnCl₂ fue llevado a cabo con las siguientes cantidades de polimerasa deficiente en la actividad de exonucleolisis: *wild-type*^{Exo-} (1,2 nM), G481F^{Exo-} (30 nM), G481L^{Exo-} (1,2 nM), W483F^{Exo-} (1,2 nM), W483L^{Exo-} (5 nM), A484E^{Exo-} (1,2

nM), E486A^{Exo-} (2,4 nM), y E486D^{Exo-} (2,4 nM). En presencia de 10 mM MgCl₂ las cantidades de DNA polimerasas fueron las siguientes: *wild-type*^{Exo-} (1,5 nM), G481F^{Exo-} (36 nM), G481L^{Exo-} (3,6 nM), W483F^{Exo-} (1,2 nM), W483L^{Exo-} (1,8 nM), A484E^{Exo-} (1,8 nM), E486A^{Exo-} (1,2 nM), y E486D^{Exo-} (1,2 nM). La estimación de la *K_m* por el nucleótido incorrecto dCTP fue llevada a cabo en presencia de 1 mM MnCl₂ y las siguientes cantidades de DNA polimerasas: *wild-type*^{Exo-} (2,4 nM), G481F^{Exo-} (17 nM), G481L^{Exo-} (7,3 nM), W483F^{Exo-} (1,8 nM), W483L^{Exo-} (6 nM), A484E^{Exo-} (7,3 nM), E486A^{Exo-} (7,3 nM), y E486D^{Exo-} (4,8 nM). Las muestras se incubaron 30 s a 25 °C, y la reacción fue parada añadiendo 10 mM EDTA. Se tuvieron en cuenta para el análisis tan sólo aquellas reacciones en las que el rango de utilización del sustrato estaba por debajo del 30%. Las muestras fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida 20%-7 M urea y se cuantificaron por densitometría de las autorradiografías. La cantidad de producto elongado fue representado frente a la concentración de dNTP. El valor de la *K_m* aparente y la *V_{max}* se obtuvieron mediante el software Kaleidagraph3.6.4. El factor de discriminación durante la adición de nucleótido se definió como la proporción entre la eficiencia catalítica de inserción del nucleótido incorrecto y correcto.

2.8. Ensayo de síntesis procesiva acoplada al desplazamiento de banda (replicación del DNA de M13)

La mezcla de incubación contenía, en 25 µl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA, 4% (v/v) glicerol, 20 mM sulfato amónico, 40 µM de cada uno de los cuatro dNTPs, 1 µCi de [α -³²P]ATP, 4,2 nM de ssDNA M13mp18 hibridado al iniciador universal de 17mer y 60 nM de DNA polimerasa, *wild-type* o mutante. Las muestras se incubaron durante los tiempos indicados a 30 °C. Las reacciones se pararon con 10 mM EDTA y 0,1% SDS y las muestras fueron filtradas a través de columnas de Sephadex G-50 con 0,1% SDS. La actividad relativa de las DNA polimerasas mutantes respecto a la *wild-type* se calculó a partir de la radiación Cerenkov correspondiente al volumen eluido de cada muestra tras el filtrado. El análisis de los tamaños se llevó a cabo mediante la desnaturalización del DNA sintetizado con 0,7 M NaOH y posterior electroforesis en gel de agarosa alcalino al 0,7% (McDonell *et al.*, 1977). Después de la electroforesis, la posición de la unidad de longitud correspondiente al DNA de M13 se detectó por tinción con bromuro de etidio del gel, el cual fue posteriormente secado y autorradiografiado.

2.9. Ensayo de replicación del TP-DNA de ϕ 29

La mezcla de reacción contenía, en 25 µl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂ o 1 mM MnCl₂ según se indique, 20 mM sulfato amónico, 1 mM DTT, 4% (v/v) glicerol, 0,1 mg/ml BSA, 20 µM de cada uno de los cuatro dNTPs, 1 µCi de [α -³²P]dATP, 1,6 nM de ϕ 29 TP-DNA, 13 nM TP y 13 nM DNA polimerasa, *wild-type* o mutante. Las muestras se incubaron durante los tiempos indicados a 30 °C. Las reacciones se pararon añadiendo 10 mM EDTA y 0,1% SDS y se

filtraron a través de columnas de Sephadex G-50 en presencia de 0,1% SDS. La actividad relativa de las DNA polimerasas mutantes respecto a la *wild-type* se calculó a partir de la radiación Cerenkov correspondiente al volumen eluido de cada muestra tras el filtrado. El análisis de los tamaños se llevó a cabo mediante la desnaturalización del DNA sintetizado con 0,7 M NaOH y posterior electroforesis en gel de agarosa alcalino al 0,7% (McDonell *et al.*, 1977). Después de la electroforesis, la posición de la unidad de longitud correspondiente al DNA de $\phi 29$ (19.285 bases) se detectó por tinción con bromuro de etidio del gel, el cual fue posteriormente secado y autorradiografiado.

El análisis de los productos de transición se llevó a cabo como se acaba de describir pero utilizando 61 nM de DNA polimerasa y 152 nM de TP, proporcionando la concentración y tipo de dNTP indicado en cada caso. Las muestras se analizaron en un gel de poliacrilamida 12%-0,1% SDS (360x280x0,5 mm) con objeto de obtener la resolución necesaria para distinguir los primeros productos de elongación.

2.10. Ensayo de iniciación de la replicación (formación del complejo TP-dAMP)

La mezcla de reacción contenía, en 25 μ l, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂ ó 1 mM MnCl₂ según se indique, 20 mM sulfato amónico, 1 mM DTT, 4% (v/v) glicerol, 0,1 mg/ml BSA, 0,2 μ M dATP, 2 μ Ci de [α -³²P]dATP, 1,6 nM de $\phi 29$ TP-DNA y las cantidades indicadas en cada ensayo de TP y DNA polimerasa, *wild-type* o mutante. En el caso de los ensayos de iniciación independiente de molde (deoxinucleotidilación de la TP) se empleó 1 mM MnCl₂ como metal activador, y las cantidades de DNA polimerasa, *wild-type* o mutante, indicadas. Las muestras se incubaron durante los tiempos indicados a 30 °C. Tras este tiempo las reacciones se pararon añadiendo 10 mM EDTA y 0,1% SDS y las muestras se filtraron a través de columnas de Sephadex G-50 en presencia de 0,1% SDS. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%-0,1% SDS. La cuantificación fue realizada mediante densitometría de las bandas correspondientes al complejo TP-dAMP, detectadas por autorradiografía.

2.11. Ensayo de amplificación del TP-DNA de $\phi 29$

La mezcla de reacción contenía, en 25 μ l, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂ ó 1 mM MnCl₂ según se indique, 20 mM sulfato amónico, 1 mM DTT, 4% (v/v) glicerol, 0,1 mg/ml BSA, 80 μ M de cada uno de los cuatro dNTPs, 1 μ Ci de [α -³²P]dATP, 16 pM de $\phi 29$ TP-DNA, 6,5 nM de TP, 6,5 nM de DNA polimerasa, *wild-type* o mutante, 30 μ M de SSB de $\phi 29$ y 30 μ M de DBP de $\phi 29$. Después de incubar durante los tiempos indicados a 30 °C, las reacciones se pararon con 10 mM EDTA y 0,1% SDS. El procesamiento de las muestras fue similar al descrito en el ensayo de replicación de $\phi 29$ TP-DNA.

2.12. Ensayo de interferencia

El ensayo consiste en una reacción de iniciación sin molde en la que se utiliza una cantidad limitante de TP y diferentes cantidades de DNA polimerasa, *wild-type* o mutante que compiten con el mutante D249E de la DNA polimerasa (catalíticamente inactivo, por lo que no dará señal en la autorradiografía, pero con capacidad intacta de interaccionar con la TP) por unirse a la TP (Blasco *et al.*, 1991). Las cantidades de proteína utilizadas para cada mutante varían ligeramente. En el caso de las polimerasas *wild-type* y K311A se emplearon 50 nM, 25 nM de TP y cantidades crecientes de D249E (de 0-100 nM en el caso de la *wild-type* y de 0-200 nM en el caso del K311A), 50 nM de los mutantes R306A, R308A e Y310A, 25 nM de TP y cantidades crecientes de D249E (0-100 nM), y 100 nM del mutante $\Delta 5$, junto con 50 nM de TP y de 0-194 nM de la DNA polimerasa competidora D249E. En todos los casos se preincubó la DNA polimerasa en estudio junto con su competidora D249E durante 5 min a 4 °C. Las muestras se activan con el resto de la mezcla de reacción que contiene 1 mM $MnCl_2$ y se incuban durante 3 h a 30 °C. La reacción se paró con 10 mM EDTA y las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%-0,1% SDS. La cuantificación fue realizada mediante densitometría de las bandas correspondientes al complejo TP-DNA polimerasa, detectadas por autorradiografía.

2.13. Ensayo de cosedimentación

La mezcla de incubación contenía, en 150 μ l, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA, 20 mM sulfato amónico, 0,6 μ M de TP y 0,6 μ M de DNA polimerasa. Después de incubar las muestras durante 30 min a 4 °C, se depositaron en la parte superior de un gradiente de glicerol continuo del 15 al 30%. El gradiente, de 4 ml, se generó en un tampón que contenía 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 20 mM sulfato amónico, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA y 7 mM 2-mercaptoetanol, y se sometió a ultracentrifugación durante 24 h, a 4 °C y 58.000 rpm (en un rotor Beckman TST 60.4) Posteriormente, se recogieron fracciones desde la parte inferior del tubo y se examinaron en geles de poliacrilamida 12%-0,1% SDS. Posteriormente los geles fueron teñidos con azul de *Coomassie*.

2.14. Ensayo de pirofosforólisis

La mezcla de reacción contenía, en 12,5 μ l, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA, 4% (v/v) glicerol, 6,5 nM de DNA polimerasa, *wild-type* o mutante, deficiente en actividad 3'-5' exonucleolítica, 1,2 nM del sustrato sp1/sp1c+6, marcado en el extremo 5', 10 mM $MgCl_2$ o 1 mM $MnCl_2$ como metal activador y la concentración indicada del pirofosfato tetrasódico (Merck). Tras incubar 5 min a 25 °C, las reacciones fueron paradas añadiendo 10 mM EDTA. Las muestras se analizaron por electroforesis en geles del 20% poliacrilamida-7M urea y posterior autorradiografía.

RESULTADOS

Capítulo I: Estudios del motivo LExE de la DNA polimerasa de ϕ 29

La estructura cristalográfica del complejo ternario de la DNA polimerasa de $\phi 29$ ha mostrado que los iones metálicos catalíticos A y B están coordinados no solo por los grupos fosfatos γ y α del nucleótido entrante y de los residuos Asp249 (motivo A) y Asp458 (motivo C), sino también por el grupo carbonilo de la Val250 (motivo A, ver Figura 7A) (Berman *et al.*, 2007), la cual está altamente conservada en el subgrupo de DNA polimerasas que inician con proteína. Además, el alineamiento múltiple de secuencias identifica un residuo conservado de Glu (Glu486 en la DNA polimerasa de $\phi 29$) (ver Figura 8), localizado en el centro activo de polimerización de las polimerasas de la familia B. Al comienzo de esta Tesis ya se había propuesto para este residuo un papel como nuevo ligando indirecto de un ion metálico no catalítico C en la DNA polimerasa de RB69 (Franklin *et al.*, 2001; Zakharova *et al.*, 2004; Shamoo y Steitz, 1999), y que está formando parte del denominado motivo LExE (Braithwaite & Ito, 1993).

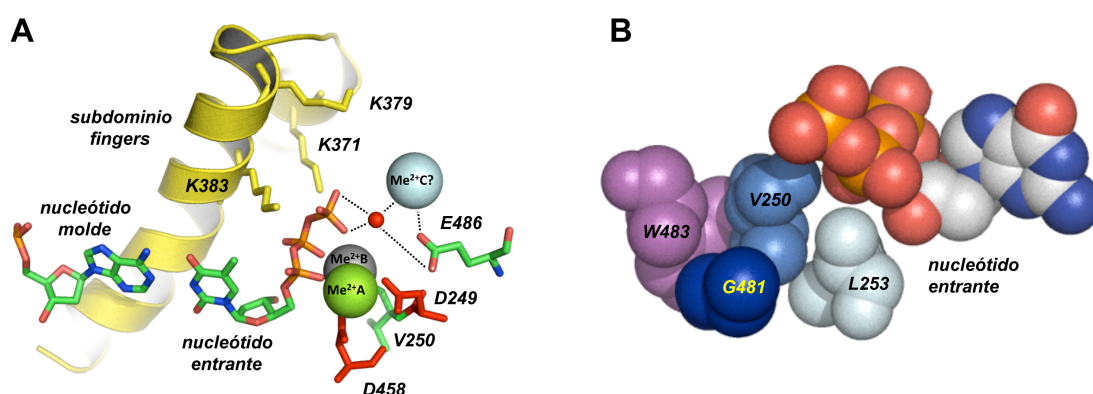


Figura 7. Sitio activo de polimerización de la DNA polimerasa de $\phi 29$. **A.** Interacción propuesta para el residuo Glu486 con la fracción de PPI del nucleótido entrante a través del tercer ion metálico. La imagen también muestra el residuo conservado de Lys del subdominio *fingers* interaccionando con el fosfato del nucleótido entrante. Los iones metálicos catalíticos A y B, indicados como esferas en verde y gris, respectivamente, están coordinados por los fosfatos α y γ del nucleótido entrante, el carboxilo del residuo Asp249 (motivo A) y del residuo Aps458 (motivo C), coloreados en rojo, y el grupo carbonilo del residuo Val250 en verde. El ion metálico no catalítico C propuesto y una molécula de agua podrían estar mediando la interacción entre el Glu486 (Motivo LExE) y el fosfato γ del nucleótido, tal y como se describe para la DNA polimerasa de RB69 (Franklin *et al.*, 2001; Zakharova *et al.*, 2004; Shamoo y Steitz, 1999). Los datos cristalográficos correspondientes al complejo ternario de la DNA polimerasa de $\phi 29$ provienen del Protein Data Bank ID code 2PYL (Berman *et al.*, 2007). **B.** El grupo carbonilo de la Val250 que interacciona con el fosfato γ del nucleótido entrante a través de su coordinación con el metal B se sitúa dentro de una cavidad estructural formada por el residuo Leu253 (perteneciente al motivo A) y los residuos Gly484 y Trp483 (del motivo LExE aquí estudiado). Los residuos y el nucleótido entrante están representados por esferas.

1.1. El motivo LExE de las DNA polimerasas replicativas

El alineamiento múltiple de secuencias de DNA polimerasas de la familia B permitió identificar un motivo conservado dentro de la región de polimerización cuya secuencia consenso es LExE (Braithwaite & Ito, 1993), (ver Figura 8).

LEXE		
bacteriana/viral	<i>HSV-1</i>	/922/ IKLECEKT
	<i>EqHV-1</i>	/923/ IKLECEKT
	<i>VZV</i>	/887/ IKLECEKT
	<i>EBV</i>	/791/ ISLEAEKT
	<i>HVSai</i>	/777/ IKLESEKT
	<i>HCMV</i>	/946/ VKLEFEKV
	<i>MCMV</i>	/827/ VRLEFEKM
	<i>HV-6</i>	/776/ IKLEFEKI
	<i>CCfV</i>	/819/ VTLEDEMR
	<i>CHV</i>	/679/ NDLEFEKI
	<i>FPV</i>	/771/ FKLEFEAI
	<i>Vac V</i>	/762/ FKLEFEAV
	<i>C.bie</i>	/800/ FNFEYEMK
	<i>AcMNPV</i>	/709/ YKMAFENL
	<i>Ldnpv</i>	/729/ YKMSLENI
	<i>RB69</i>	/682/ MFMDFEAI
	<i>E.c. pol II</i>	/590/ LELEFEETH
	<i>Vent</i>	/578/ LELEFEFG
	<i>P. Furiosus</i>	/576/ LELEFEFG
	<i>S.solfata</i>	/682/ LDLEVDKT
celular	<i>S.c. pol II</i>	/939/ IFFFEVDGP
	<i>Pocc. Pol II</i>	/718/ LDLEVDKV
	<i>H. Pol δ</i>	/790/ IRLEFEKV
	<i>B. Pol δ</i>	/789/ IRLEFEKV
	<i>S.c. Pol δ</i>	/797/ INLEFEKA
	<i>S.p. Pol δ</i>	/776/ IKLEFEKV
	<i>P.f. Pol δ</i>	/770/ IKLEFEKV
	<i>H. Pol α</i>	/1036/ LEIDIDGV
	<i>D.m. Pol α</i>	/1045/ LEIDIDGV
	<i>S.c. Pol α</i>	/1030/ LEIDIDNV
proteína terminal	<i>S.p. Pol α</i>	/1016/ LEIDIDNV
	<i>T.b. Pol α</i>	/933/ LEIDIDGV
	<i>S.c. Rev3</i>	/1177/ IFLKFEKV
	<i>Adenovirus</i>	/910/ WLVEEETV
	<i>pSKL</i>	/909/ LDSTIDKT
	<i>pGKL-2</i>	/904/ LDSTIDDT
	<i>pAI-2</i>	/1063/ GLMKHEYT
	<i>kalilo</i>	/883/ GKMKYEYV
	<i>maranhar</i>	/882/ GKFKAEYN
	<i>Gelasinospira</i>	/903/ GKMKYEYV
	<i>S1</i>	/738/ GKFKHEHF
	<i>B. napus</i>	/806/ GKFKLEYE
	<i>F. velutipes</i>	/809/ GKFKLEHI
	<i>pMC3-2</i>	/790/ GKFKKEIT
	<i>pAL2-1</i>	/937/ QGFKLEFK
	<i>pCLK-1</i>	/974/ GKFKLEHT
	<i>P. kluyveri</i>	/984/ GKFKTEHV
	<i>pEM</i>	/713/ GKFKLEHK
	<i>P. purpurea</i>	/504/ GLKLADTY
	<i>pGKL-1</i>	/907/ QLELEAT
	<i>PRD1</i>	/448/ GAWDLEAT
	<i>CP1</i>	/481/ GKWAHEGR
	<i>GA1</i>	/482/ GYWDHEAT
	<i>M2</i>	/478/ GYWAHEST
	<i>B103</i>	/478/ GYWAHEST
	<i>PZA</i>	/478/ GYWAHEST
	<i>Nf</i>	/478/ GYWAHEST
	<i>φ29</i>	/481/ GYWAHEST

Figura 8. Alineamiento múltiple de secuencias del motivo LEXE de las DNA polimerasas de la familia B. Las DNA polimerasas de la familia B están agrupadas en tres subgrupos: bacterianas/virales, celulares y aquellas que inician la replicación con proteína (subgrupo proteína terminal). La nomenclatura de estas DNA polimerasas y sus secuencias se han obtenido de Braithwaite & Ito, (1993), a excepción de las DNA polimerasas siguientes: del fago de *Enterobacteria* RB69 (RB69; número de acceso del GenBankTM NP_861746); DNA polimerasa II de *Pyrodictum occultum* (pol II; número de acceso del GenBankTM BAA07579); DNA polimerasa δ de *Schizosaccharomyces pombe* (S.p. pol δ; número de acceso del GenBankTM AAA3503); DNA polimerasas de plásmidos mitocondriales lineales de *Gelasinospora* sp. (número de acceso del GenBankTM S62752); *Brassica napus* (número de acceso del GenBankTM NP862323); *Flammulina velutipes* (número de acceso del GenBankTM BAB13496); *Pichia kluyveri* (número de acceso del GenBankTM CAA72340); *Porphyrha purpurea* (número de acceso del GenBankTM NP_049297); *Morchella conica* (pMC3-2; número de acceso del GenBankTM CAA45364); DNA polimerasa del plásmido lineal pAL2-1 de *Podospora anserina* (pAL2-1; número de acceso del GenBankTM X60707); DNA polimerasa del fago Cp-1 de *Streptococcus pneumoniae* (número de acceso del GenBankTM Q37989); y las DNA polimerasas de los bacteriófagos de *B. subtilis* GA-1 (GA-1; número de acceso del GenBankTM NP_073685) y PZA (PZA; número de acceso del GenBankTM AAA88478). Los números entre barras indican la posición del primer aminoácido alineado con respecto al extremo N-terminal de la secuencia de cada DNA polimerasa. El primer y segundo residuo de Glu están en letra blanca y cian, respectivamente. Los residuos de Gly y de Trp/Phe, conservados en el subgrupo de las polimerasas que inician con TP están indicados en letra azul y verde, respectivamente. Otros residuos moderadamente conservados están en letras negras sobre fondo gris. Los residuos de la DNA polimerasa de φ29 Gly481, Trp483, Ala484 y Glu486, estudiados aquí, se indican con puntos negros.

La resolución cristalográfica de la estructura de la DNA polimerasa del bacteriófago RB69 permitió proponer un papel como ligando indirecto de metal para el segundo Glu del motivo LEXE (Glu686), el cual podría interaccionar con el fosfato γ del nucleótido entrante a través de un ion metálico no catalítico y una molécula de agua en el sitio activo de polimerización de la DNA polimerasa (Shamoo y Steitz, 1999; Franklin *et al.*, 2001; Zakharova *et al.*, 2004). En el subgrupo de las DNA polimerasas que inician con proteína, sólo está conservado el segundo Glu. Precediendo al primer Glu encontramos una Leu en la mayoría de los miembros de los

grupos de DNA polimerasas celular y bacteriana/viral mientras que en el grupo de DNA polimerasas que inician con proteína está presente un residuo aromático (Phe/Trp) (identificado en verde en la Figura 8). Además, este grupo de DNA polimerasas que inician con proteína presenta una Gly conservada localizada dos posiciones hacia el extremo N-terminal del residuo aromático antes mencionado (en azul en la Figura 8) mientras que en el resto de grupos de DNA polimerasas se encuentra Leu o Ile.

La resolución cristalográfica de la estructura ternaria de la DNA polimerasa de $\phi 29$ nos muestra que los residuos correspondientes del motivo LExE, Gly481 y Trp483, parecen formar una cavidad estructural junto con el residuo Leu253 (perteneciente al motivo A) (Berman *et al.*, 2007). Dicho "bolsillo" hidrofóbico podría acomodar la cadena lateral de la Val250 (ver Figura 7B), residuo implicado en la coordinación del metal B (Berman *et al.*, 2007; Pérez Arnaiz *et al.*, 2010).

1.2. Mutagénesis dirigida a los residuos del motivo LExE.

Para analizar el efecto de las mutaciones en cada uno de los aminoácidos del motivo LExE, se realizaron cambios puntuales en los residuos Trp483, Ala484 y Glu486 de la DNA polimerasa de $\phi 29$. También se mutó un residuo aminoacídico previo al motivo LExE, la Gly481 a Leu (G841L), al estar presente en la mayoría de los miembros de los otros grupos de DNA polimerasas B y que se cambió a Phe (G481F) ya que algunos de los miembros del grupo de DNA polimerasas bacterianas/virales presentaban este residuo en dicha posición. El Trp483 fue sustituido por Phe (W483F) ya que este residuo se encuentra en otros miembros del grupo de las DNA polimerasas que inician con proteína, y por Leu (W483L) al estar presente en los demás grupos de las DNA polimerasas de la familia B. La Ala484 se cambió a Glu (A484E) como en el caso de las DNA polimerasas celulares, virales y bacterianas. Finalmente, el residuo Glu486 se cambió por Ala (E486A) para eliminar la carga negativa, y por Asp (E486D) manteniendo así la carga negativa. Las mutaciones puntuales y la purificación de las proteínas se llevaron a cabo como se describe en el apartado de Materiales y Métodos.

1.3. Actividad de polimerización de las DNA polimerasas mutantes.

Como en la mayoría de replicasas, las actividades de polimerización y exonucleolisis residen en los dominios estructuralmente independientes C- y N-terminal, respectivamente (Blanco y Salas, 1996; Kamtekar *et al.*, 2004). A pesar de su separación estructural, ambos dominios deben trabajar coordinados para asegurar una síntesis eficiente y fiel del DNA, evitando la acumulación de errores en la cadena de nueva síntesis sin comprometer la tasa de elongación. La elección de sintetizar o degradar la cadena iniciadora depende de varios factores como la velocidad relativa de ambas actividades y la estabilización comparativa del sustrato en cada sitio activo (Joyce y Steitz, 1994). Para evaluar cómo los cambios aminoacídicos introducidos afectan

el equilibrio dinámico entre la actividad de polimerización y la actividad exonucleasa 3'-5' de las DNA polimerasas mutadas, estudiamos el funcionamiento acoplado de síntesis y degradación sobre una molécula híbrida de tipo iniciador/molde (sp1/sp1c+6) en función de la concentración de dNTP (Figura 9A y Materiales y Métodos). En ausencia de nucleótidos, las únicas bandas que se detectan corresponden a los productos de degradación del *primer* debido a la actividad de exonucleolisis 3'-5'. En estas condiciones podemos ver las diferencias en los niveles de actividad exonucleolítica de las DNA polimerasas mutantes. Como se esperaba, debido a la localización del motivo conservado LExE en el dominio de polimerización, ninguna de las proteínas mutantes presentó deficiencias significativas en la degradación de la cadena iniciadora, a excepción de la polimerasa mutante G481F. A medida que la concentración de dNTP no marcado aumenta, la actividad de exonucleolisis 3'-5' es progresivamente competida por la actividad de polimerización 5'-3'. La incorporación del dNMP se observa como el incremento del tamaño de la cadena iniciadora marcada, lo que nos permite determinar la cantidad de dNTP necesaria para lograr una elongación eficiente en cada una de las DNA polimerasas. Cuando usamos como metal activador $MgCl_2$ y en presencia de 50 nM dNTPs la DNA polimerasa *wild-type* presenta un desplazamiento del equilibrio hacia la actividad de polimerización, patrón seguido únicamente por el mutante A484E (Figura 9A). Sin embargo, el resto de los mutantes no son capaces de desplazar este equilibrio a 100 nM dNTPs. Así, los mutantes W483L y G481F no dieron lugar a ningún producto de elongación mientras que los mutantes G481L, W483F, E484A y E486D sólo elongaron hasta la posición +1 a la concentración de dNTPs más alta. Es de destacar igualmente el aumento de la actividad nucleolítica en los mutantes E486A y E486D, presentando niveles superiores a los de la DNA polimerasa *wild-type*.

Cualquier deficiencia en la incorporación de nucleótidos, así como una mutación en el centro activo de polimerización podría resultar en un aumento de la actividad exonucleolítica sobre la actividad de polimerización, impidiendo el análisis específico de las características de síntesis de la enzima. Por esto, todos los mutantes de la DNA polimerasa de $\phi 29$ fueron construidos también en su forma carente de actividad exonucleasa, es decir, con mutaciones en sus dos residuos de aspártico conservados (D12A/D66A) responsables de esta actividad (ver Materiales y Métodos).

La DNA polimerasa D12A/D66A se utiliza como control del centro activo de polimerización *wild-type*. Cuando usamos $MgCl_2$ como metal activador, tanto la *wild-type*^{Exo-} como el mutante A484E^{Exo-} son capaces de elongar la molécula iniciadora hasta la posición de 20mer con 5 nM de dNTPs (Figura 9B). Sin embargo, el resto de los mutantes, excepto el G481F^{Exo-}, solo es capaz de incorporar un nucleótido a dicha concentración de dNTP. Estos resultados nos permiten concluir que los defectos observados en la actividad de polimerización, especialmente en los mutantes E486A y E486D, no son atribuibles a una mayor actividad exonucleolítica sino a una deficiencia específica en la catálisis de la actividad de polimerización.

Es interesante señalar que, cuando usamos como metal activador Mn^{2+} , a excepción del mutante G481F^{Exo-}, la actividad de polimerización del resto de los mutantes mejora de manera significativa, logrando llegar a la posición de 20mer con 5 nM de dNTPs tal y como hace la polimerasa *wild-type*^{Exo-} (Figura 9C).

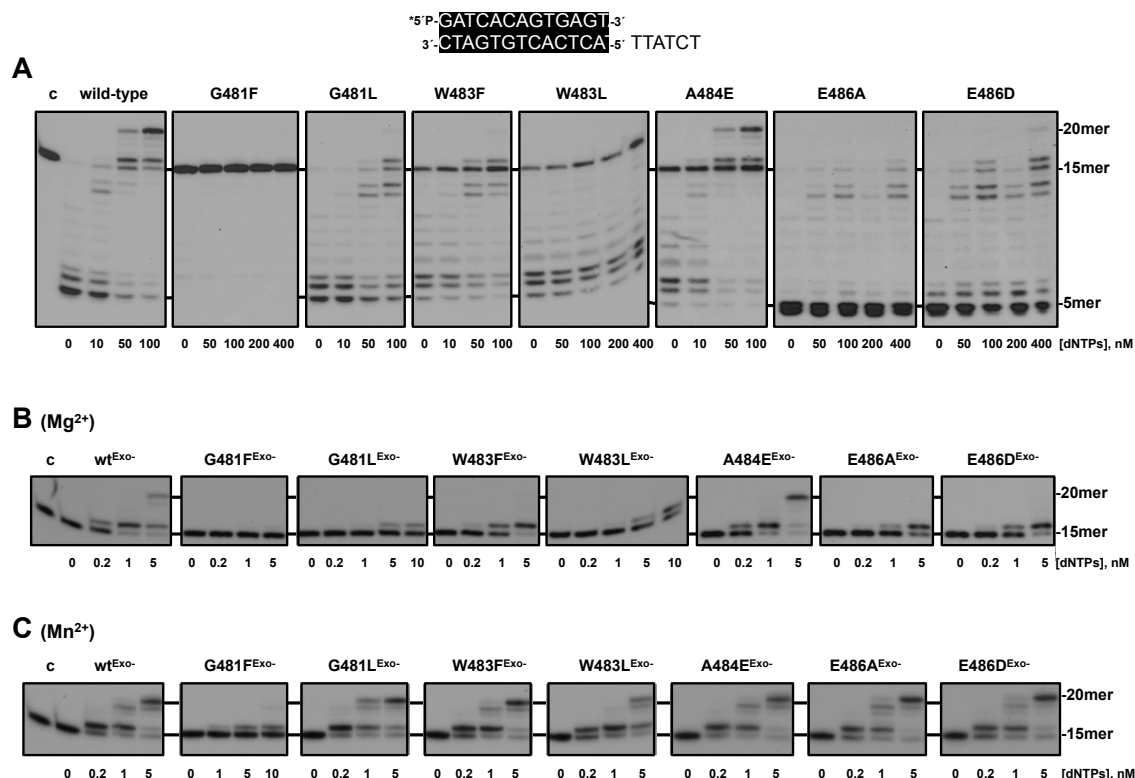


Figura 9. Mutaciones en el motivo LExE de la DNA polimerasa de $\phi 29$ afectan al equilibrio entre las actividades de polimerización y exonucleolisis 3'-5'. **A.** Ensayo del balance Exo/pol de las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes. El ensayo se realizó como se describe en el apartado de Materiales y Métodos, usando la molécula híbrida sp1/sp1c+6 como DNA iniciador/molde, las concentraciones indicadas de dNTPs y 10 mM $MgCl_2$ como metal activador. El asterisco indica que la molécula híbrida está marcada en el extremo 5' de la cadena iniciadora (15mer). La actividad de polimerización o de exonucleolisis 3'-5' se detecta por el aumento o la disminución, respectivamente, del tamaño (15mer) del sustrato marcado. El análisis de la actividad de polimerasas carentes de actividad exonucleolítica se llevó a cabo como se describe en el apartado **A**, usando el mismo sustrato, las cantidades indicadas de dNTPs, y como metal activador 10 mM $MgCl_2$ en **B** y 1 mM $MnCl_2$ en **C**. c: control de DNA.

1.4. Afinidad por nucleótido de las DNA polimerasas mutantes de $\phi 29$

Para medir la eficiencia catalítica de las DNA polimerasas mutantes por el nucleótido correcto, se llevaron a cabo ensayos cinéticos en estado estacionario de la adición de un dNTP en un sustrato tipo iniciador/molde (ver Materiales y Métodos). Como se muestra en la Tabla I, la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) de los mutantes G481F, G481L, W483F, W483L, A484E y D486D fue 14.905, 8, 5, 34, 3, 19 y 13 veces menor que la de la polimerasa *wild-type*, respectivamente, debido fundamentalmente al aumento del valor de la K_m para esos residuos, lo que sugiere una baja afinidad de unión del nucleótido.

Tabla I. Parámetros cinéticos de la adición de un único nucleótido para las DNA polimerasas mutantes de $\phi 29$ con Mg^{2+}

	DNA polimerasas mutantes							
	<i>wild-type</i>	G481F	G481L	W483F	W483L	A484E	E486A	E486D
K_m (nM)	$3 \pm 0,3$	2634 ± 93	12 ± 4	23 ± 4	113 ± 10	8 ± 2	74 ± 1	54 ± 6
k_{cat} (s^{-1})	0,77	0,05	0,37	1,1	0,86	0,81	0,99	1,02
k_{cat}/K_m ($nM^{-1}s^{-1}$)	0,255	$1,7 \times 10^{-5}$	$3,1 \times 10^{-2}$	$4,7 \times 10^{-2}$	$7,5 \times 10^{-3}$	0,1	$1,3 \times 10^{-2}$	$1,9 \times 10^{-2}$

K_m constante de Michaelis.

k_{cat} constante catalítica.

Tabla II. Fidelidad en la inserción de nucleótidos de las DNA polimerasas mutantes de $\phi 29$

	Parámetros cinéticos de inserción del nucleótido correcto			Parámetros cinéticos de inserción del nucleótido incorrecto				
	K_m (nM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($nM^{-1}s^{-1}$)	K_m (nM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($nM^{-1}s^{-1}$)	f_{dis}	f_{rel}
<i>wild-type</i>	1 ± 2	0,8	0,8	24 ± 2	4×10^{-2}	$1,6 \times 10^{-3}$	480	1
G481F	26 ± 2	$5,1 \times 10^{-2}$	$1,9 \times 10^{-3}$	89 ± 1	$1,5 \times 10^{-2}$	$1,6 \times 10^{-4}$	12	41
G481L	7 ± 2	0,16	$2,3 \times 10^{-2}$	83 ± 4	$1,2 \times 10^{-2}$	$1,4 \times 10^{-4}$	164	3
W483F	7 ± 2	0,17	$2,4 \times 10^{-2}$	29 ± 4	$3,2 \times 10^{-2}$	$1,1 \times 10^{-3}$	22	22
W483L	$4 \pm 0,5$	0,29	$7,2 \times 10^{-2}$	132 ± 12	7×10^{-3}	$5,3 \times 10^{-5}$	1373	0,3
A484E	$3 \pm 0,2$	0,27	$8,8 \times 10^{-2}$	27 ± 6	$3,6 \times 10^{-2}$	$1,3 \times 10^{-3}$	68	7
E486A	8 ± 1	0,16	$1,9 \times 10^{-2}$	92 ± 2	$1,8 \times 10^{-2}$	$1,9 \times 10^{-4}$	98	5
E486D	7 ± 1	0,2	$2,8 \times 10^{-2}$	100 ± 9	$1,8 \times 10^{-2}$	$1,8 \times 10^{-4}$	159	3

K_m constante de Michaelis.

k_{cat} constante catalítica.

f_{dis} factor de discriminación $k_{cat}/K_m(\text{correcto})/k_{cat}/K_m(\text{incorrecto})$

f_{rel} (factor relativo) se calcula como cociente de $f_{dis}(\text{wt})/f_{dis}(\text{mut})$

Para estudiar cómo los cambios introducidos en el motivo LExE afectan la capacidad de discriminación de nucleótido de las DNA polimerasas mutantes, se evaluó la incorporación de un nucleótido correcto (dTTP) e incorrecto (dCTP) a diferentes concentraciones de dNTP en condiciones de estado estacionario. Los datos fueron posteriormente analizados para determinar la correspondiente eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) tal y como se describió previamente (Creighton *et al.*, 1995) (ver Materiales y Métodos). Estos ensayos se realizaron en presencia de Mn^{2+} ya que muchas de las DNA polimerasas mutantes no dieron productos medibles con Mg^{2+} en las condiciones experimentales usadas. La Tabla II muestra las constantes cinéticas para la inserción del nucleótido correcto e incorrecto, y el factor de discriminación contra la inserción de un nucleótido incorrecto (f_{dis}) obtenido durante la incorporación del nucleótido fue calculado con la

fórmula siguiente $(k_{cat}/K_m)_{correcto}/(k_{cat}/K_m)_{incorrecto}$. Por tanto, aunque la polimerasa *wild-type* muestra un f_{dis} de 480, el resto de mutantes mostraron valores mucho menores de f_{dis} , a excepción del mutante W483L, lo que nos permite concluir que los cambios introducidos en el motivo LExE comprometen la fidelidad de inserción de nucleótidos.

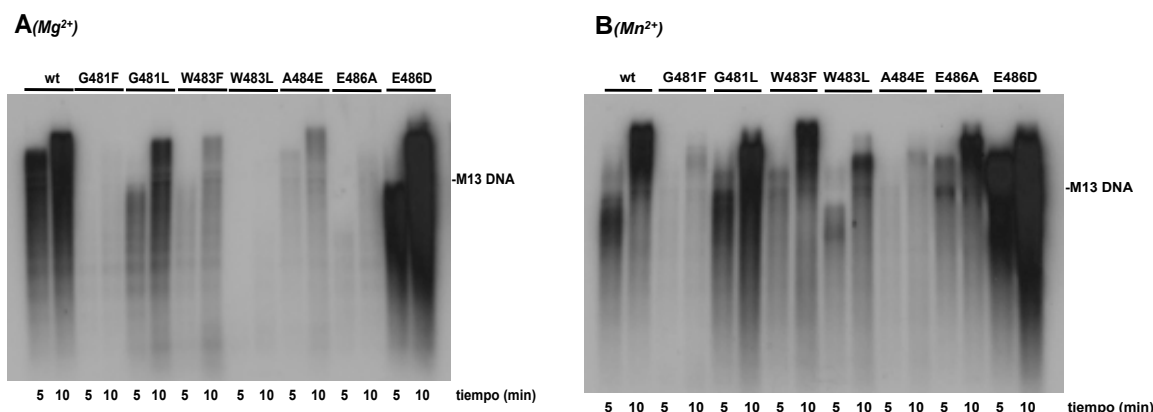


Figura 10. Replicación del DNA de M13 acoplado a desplazamiento de banda por las DNA polimerasas de $\phi 29$ mutadas en el motivo LExE. La replicación del DNA de M13 se llevó a cabo como se explica en el apartado de Materiales y Métodos, usando 40 μ M dNTPs, 61 nM de DNA polimerasa de $\phi 29$ *wild-type* o mutante y 10 mM $MgCl_2$ (A) o 1 mM $MnCl_2$ (B) como metal activador. Tras incubar los tiempos indicados a 30 °C, se calculó el valor de actividad relativa a partir de la cantidad de dNTP incorporado (ver Tabla III). La longitud del DNA de M13 sintetizado se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa alcalina al 0,7% y posterior autorradiografía. La posición del tamaño unidad del DNA de M13 está indicado a la derecha.

1.5. Síntesis de DNA procesiva acoplada al desplazamiento de banda de las DNA polimerasas mutantes.

La DNA polimerasa de $\phi 29$ se caracteriza por su capacidad de acoplar el desplazamiento de banda a la síntesis procesiva de DNA (Blanco *et al.*, 1989). Estas dos características (procesividad y desplazamiento de banda) permiten a la DNA polimerasa realizar la replicación del DNA de $\phi 29$ sin necesidad de factores accesorios de procesividad o de proteínas tipo helicasas. Para analizar la capacidad de las DNA polimerasas mutantes de $\phi 29$ en realizar la síntesis de DNA procesiva acoplada a desplazamiento de banda, usamos como molde el ssDNA circular del fago M13 al que se le ha hibridado un *primer* universal que aportará el grupo -OH necesario para iniciar la replicación. La primera ronda de replicación no requiere desplazamiento de banda, pero una vez completada, la DNA polimerasa se encuentra con el extremo 5' del *primer* y a partir de aquí necesita acoplar su capacidad de desplazar banda para continuar la síntesis de DNA. Como se muestra en la Figura 10A y en la Tabla III, en presencia de Mg^{2+} , los mutantes G481F, W483L y E486A presentan una actividad replicativa muy afectada. Los mutantes G481L, W483F y A484E muestran niveles menores de actividad sobre el sustrato de M13 respecto a la polimerasa *wild-type* (1,5; 4 y 7 veces menor, respectivamente) siendo el tamaño de los productos sintetizados por los dos primeros menor (comparar los tiempos de 5 min en la Figura 10A), lo

que sugiere una disminución en la velocidad de síntesis. Al igual que en los ensayos de *exo/pol*, la presencia de Mn^{2+} promueve la recuperación parcial (mutante W483L) o total (mutantes G481L y W483F) de la actividad de polimerización, a diferencia de los mutantes G481F y A484E, donde la eficiencia de polimerización no mejora (Figura 10B). La presencia de Mn^{2+} no sólo aumenta la cantidad de producto elongado en los mutantes E486A y E486D, sino que también se ve un aumento en la velocidad de replicación con respecto a la polimerasa *wild-type*.

Tabla III. Síntesis procesiva de DNA por las DNA polimeresas de $\phi 29$ *wild-type* y mutantes

Ensayo	Ión metálico	Mutantes de la DNA polimerasa de $\phi 29$ ^a							
		<i>wild-type</i>	G481F	G481L	W483F	W483L	A484E	E486A	E486D
Replicación de M13	Mg^{2+}	100	6,7±0,9	65,9±3,6	23,8±1,4	4,3±0,9	14,7±1,3	15,6±2,5	158,5±3,7
	Mn^{2+}	100	14,8±0,6	150±6,0	85,5±2,7	44,3±4,7	20,9±3,4	124,6±3,3	178,7±3,0
Replicación del TP-DNA de $\phi 29$	Mg^{2+}	100	0,3±0,1	3,5±0,7	3,1±0,9	0,2±0,01	19±2,1	0,5±0,1	7,2±0,9
	Mn^{2+}	100	7,2±0,2	86,8±2,0	49,6±2,6	5,2±0,6	23,9±2,4	69,1±1,6	158,7±7,8
Iniciación del TP-DNA de $\phi 29$	Mg^{2+}	100	10±0,4	20±2,1	17±1,6	2±0,3	25±0,4	8±0,7	26±1,0
	Mn^{2+}	100	8±0,3	53±4,8	43±2,5	5±0,5	21±1,9	21±2,1	47±3,1

^a Los números indican el porcentaje de actividad relativo a la enzima *wild-type* obtenidos de al menos tres experimentos.

1.6. Comportamiento de las DNA polimerasas mutantes en los procesos de iniciación y Replicación del TP-DNA de $\phi 29$.

La replicación del DNA de $\phi 29$ requiere el reconocimiento de los dos extremos del DNA del fago, donde se encuentran los orígenes de replicación, por el heterodímero compuesto por la DNA polimerasa de $\phi 29$ y una molécula libre de TP con el objetivo de poder catalizar la incorporación dirigida por molde de dAMP al grupo -OH de la Ser232 de la TP (reacción de iniciación). Este complejo de iniciación es posteriormente elongado gracias al desplazamiento de banda hasta sintetizar el tamaño completo del DNA (Salas, 1999; Salas y de Vega, 2008). Para averiguar en qué medida se afecta el proceso de replicación por las mutaciones introducidas se realizaron ensayos basados en el sistema mínimo de replicación formado por TP, DNA polimerasa y TP-DNA de $\phi 29$ (Blanco *et al.*, 1989). Como se muestra en el panel superior de la Figura 11A y en la Tabla III, en presencia de Mg^{2+} los defectos mostrados por las DNA polimerasas mutantes en la replicación del TP-DNA son mayores incluso que los mostrados en la replicación del DNA de M13. Este hecho nos llevó a analizar los primeros pasos de la replicación del TP-DNA.

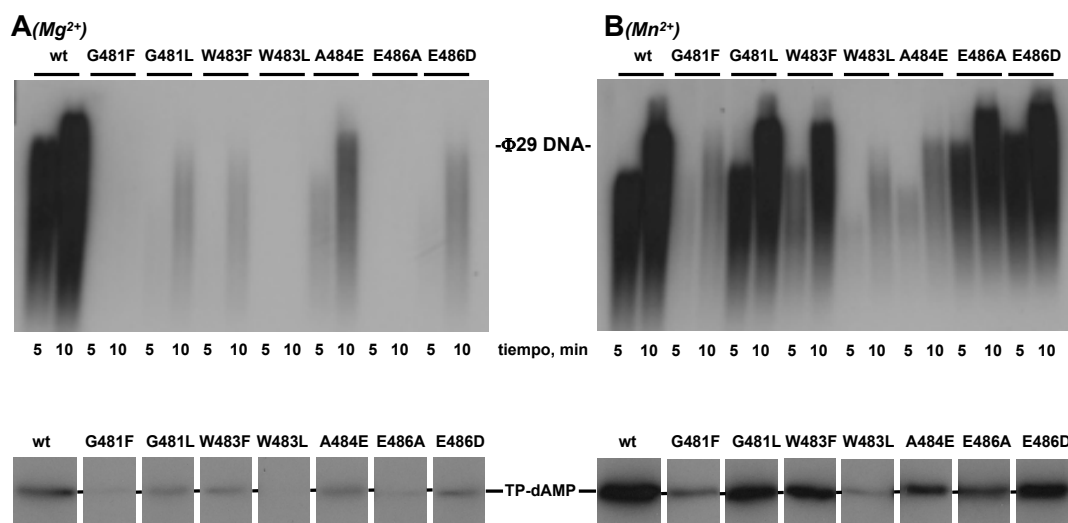


Figura 11. Replicación del TP-DNA de $\phi 29$ por las DNA polimerasas mutantes de $\phi 29$ en el motivo LExE.
A. Panel superior, replicación del TP-DNA de $\phi 29$ en presencia de Mg^{2+} . El ensayo fue llevado a cabo como se describe en el apartado de "Materiales y Metodos" en presencia de 12 nM de DNA polimerasa *wild-type* o mutante, 12 nM de TP, y 10 mM $MgCl_2$ como metal activador. Tras incubar los tiempos indicados a 30 °C, se calculó el valor de actividad relativa (ver Tabla III). La longitud del TP-DNA sintetizado se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa alcalina al 0,7% y posterior autorradiografía. Se indica la altura a la que migra el tamaño unidad del DNA de $\phi 29$. **Panel inferior,** reacción de iniciación con molde en presencia de Mg^{2+} . El ensayo de iniciación fue llevado a cabo como se describe en el apartado "Materiales y Métodos" en presencia de 19 nM de DNA polimerasa, *wild-type* o mutante, 19 nM de TP purificada, y 10 mM $MgCl_2$ como metal activador. Tras incubar 4 min a 30 °C, las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE y posterior autorradiografía. **B. Panel superior,** replicación del TP-DNA de $\phi 29$ en presencia de Mn^{2+} . El ensayo se llevó a cabo como en A en presencia de 1 mM $MnCl_2$. Tras la incubación a los tiempos indicados a 30 °C, las muestras se procesaron como se ha descrito anteriormente. **Panel inferior,** actividad de iniciación en presencia de Mn^{2+} . El ensayo de iniciación se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, en presencia de 2,4 nM de la DNA polimerasa *wild-type* o mutante, 4,8 nM de la TP purificada y 1 mM $MnCl_2$. Tras la incubación durante 2 min a 30 °C, las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE y autorradiografía.

Para estudiar la actividad de iniciación de las DNA polimerasas mutantes se evaluó la formación del complejo TP-dAMP (reacción de iniciación) usando como molde el TP-DNA de $\phi 29$. Como se muestra en la parte inferior de la Figura 11A (ver también Tabla III) las DNA polimerasas mutantes están fuertemente (G481F, W483L y E486A) o moderadamente (G481L, W483F, A484E y E486D) afectadas en la capacidad de llevar a cabo el proceso de iniciación. Por tanto, las deficiencias vistas anteriormente en la actividad de replicación durante los ensayos con el DNA de M13 podrían estar agravadas por la deficiencia adicional en la actividad de iniciación. La presencia de iones de Mn^{2+} mejora la eficiencia de replicación de los mutantes de manera similar a lo descrito en los ensayos de replicación del DNA de M13, mostrando una recuperación prácticamente completa en los mutantes G481L, W483F, E486A y E486D (como se ve en el panel superior de la Figura 11B y Tabla III). Como ya hemos visto anteriormente, la presencia de Mn^{2+} incrementa la velocidad de replicación de los mutantes E486A y E486D hasta niveles *wild-type*, de manera similar a la estimulación observada durante la reacción de iniciación (ver panel inferior de Figura 11B) en presencia de este mismo metal.

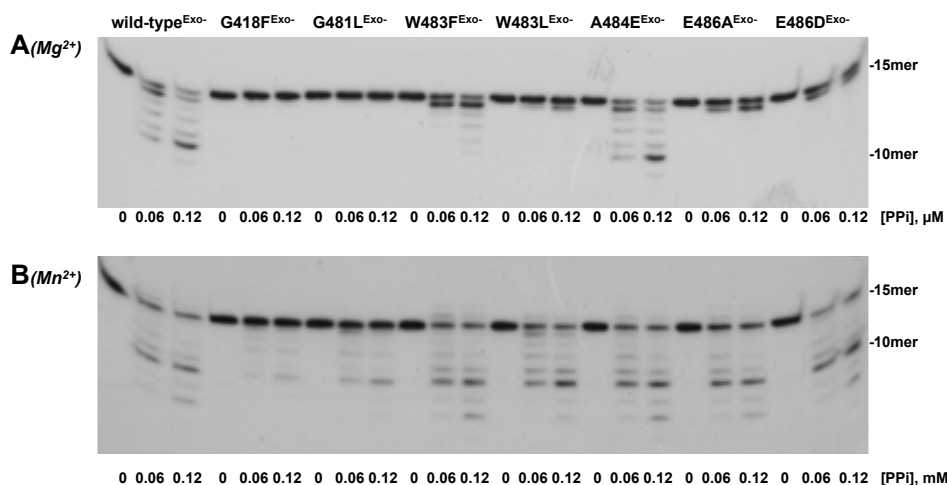


Figura 12. Actividad pirofosforolítica de las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes E486A y E486D. La actividad opuesta a la reacción de polimerización en la molécula híbrida tipo iniciador/molde de 15/21mer puede observarse cuando se adicionan las cantidades indicadas de pirofosfato inorgánico usando 10 mM $MgCl_2$ (**A**) o 1 mM $MnCl_2$ (**B**) como metal activador en cada caso (ver "Materiales y Métodos"). Para evitar que la actividad exonucleolítica actúe sobre el sustrato, el ensayo se realizó con las DNA polimerasas correspondientes carentes de esta actividad. En la autorradiografía del gel de poliacrilamida se indican la posición de la molécula sin degradar (15mer) y la del producto de degradación pirofosforolítica de 10mer.

1.7. Actividad pirofosforolítica de las DNA polimerasas mutantes.

Junto con la actividad exonucleolítica 3'-5', la DNA polimerasa de $\phi 29$ presenta otra actividad degradativa dependiente de PPi (Blasco *et al.*, 1991). Esta actividad, cuyo sustrato óptimo es un DNA de doble cadena con un extremo 5'-protuberante, puede considerarse la inversa a la reacción de polimerización ya que actúa en dirección 3'-5' liberando dNTPs. Por tanto, analizamos el posible efecto de las mutaciones introducidas en el motivo LExE sobre la actividad pirofosforolítica, usando como sustrato la molécula híbrida sp1/sp1c+6 (15/21mer) (ver Materiales y Métodos). Para eliminar el posible efecto de la actividad exonucleasa en los datos de actividad pirofosforolítica, se usaron las DNA polimerasas mutantes deficientes en actividad exonucleolítica. Como se muestra en la Figura 12, la adición de cantidades crecientes de PPi da lugar a la pirofosforolisis, indicada por la aparición de productos más cortos. Cuando usamos como metal activador Mg^{2+} (Figura 12A), tanto la DNA polimerasa *wild-type* como el mutante A484E presentaron una actividad similar de pirofosforolisis, siendo capaces de disminuir la longitud del *primer* de 15mer a 9mer. Por el contrario, el resto de los mutantes fueron muy ineficientes en esta actividad. Aunque algunos mutantes como el W483F, W483L, E486A y E486D dieron lugar a un producto de -1nt (14mer), en otros como el G481F y G481L no se detecta actividad alguna. Estos resultados son semejantes a los obtenidos en los ensayos de polimerización sobre la molécula híbrida 15/21mer en presencia del ión Mg^{2+} (comparar Figura

9B y 12A). De manera similar ocurre cuando comparamos estos dos ensayos en presencia de Mn^{2+} como metal activador. A excepción de los mutantes G481F y G481L, todos los mutantes presentan una actividad pirofosforolítica similar a la actividad de la enzima *wild-type* (Figura 12B).

Capítulo II: Implicación del subdominio TPR1 de la DNA polimerasa de ϕ 29 en la estabilización de los sustratos DNA y TP

En la estructura del apoenzima de la DNA polimerasa de $\phi 29$ se puede observar la presencia de un *loop* en el subdominio TPR1 que muestra una estructura β -giro- β (residuos 302-316) y que se encuentra plegado de tal forma que bloquea la entrada del canal de acceso al centro activo de polimerización (Figura 13A, Kamtekar *et al.*, 2006) que impediría la unión del dominio iniciador de la TP o del DNA a este centro activo. La resolución cristalográfica de la estructura del complejo DNA polimerasa/TP (Kamtekar *et al.*, 2006) mostró que tanto el dominio intermedio como el dominio iniciador de la TP establecen un elevado número de contactos con la DNA polimerasa. Concretamente, el dominio intermedio de la TP interacciona con la región TPR1 de la DNA polimerasa, lo que le permitiría actuar como punto de anclaje a la DNA polimerasa en los primeros pasos de la replicación (Pérez-Arnaiz *et al.*, 2007). En el complejo se puede observar un cambio conformacional del *loop* del TPR1 de la DNA polimerasa que se curva hacia afuera permitiendo de esta forma que el dominio iniciador de la TP, que contiene la Ser232 iniciadora, entre en el centro activo de polimerización (Pérez-Arnaiz *et al.*, 2007).

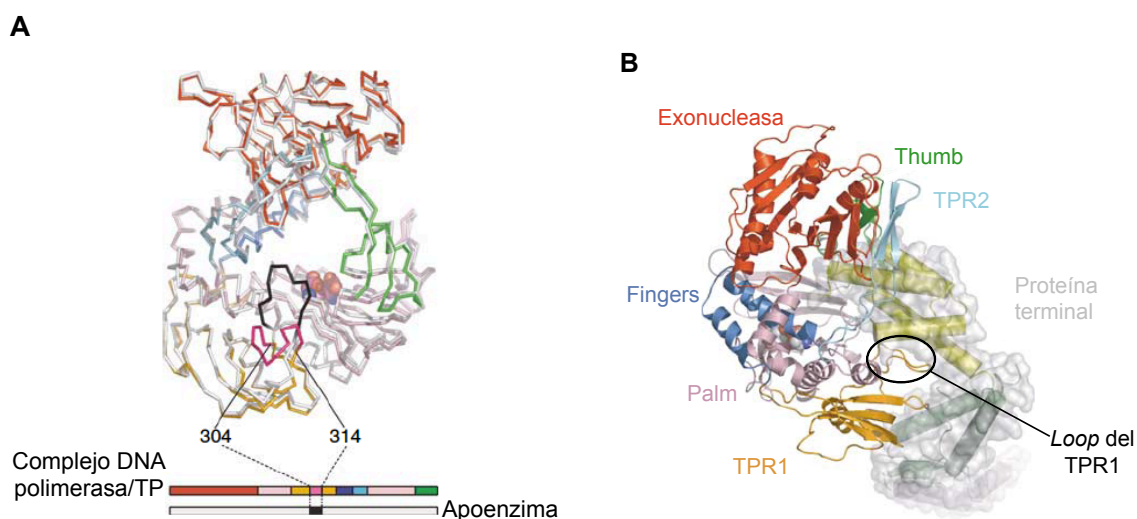


Figura 13. Estructura de la DNA polimerasa. *A*, traza de los C_{α} de la polimerasa cuando forma complejo con la TP (en color) superpuesta a la del apoenzima (en blanco). Solo existe un cambio significativo en la posición del *loop* del TRP1 entre los residuos 304 y 314 (en color magenta en el heterodímero y color negro en la apoenzima). El sitio activo de polimerización se indica mediante la representación en esferas de los carboxilatos que coordinan el ion metálico catalítico. *B*, Representación de la estructura del heterodímero DNA polimerasa/TP. La DNA polimerasa se representa en *ribbons* y la TP se representa como cilindros bajo superficie transparente. La TP interacciona con el *loop* (enmarcado en un círculo) del subdominio TPR1 de la DNA polimerasa que se encuentra curvado hacia afuera, permitiendo el acceso del dominio iniciador de la TP al centro activo de polimerización. (Adaptada de Kamtekar *et al.*, 2006).

Estudios bioquímicos previos ya demostraron la importancia del subdominio TPR1 de la DNA polimerasa tanto en la interacción con la TP como con el DNA (Dufour *et al.*, 2000; Dufour

et al., 2003). El análisis bioquímico de mutantes de la DNA polimerasa de $\phi 29$ en los residuos conservados Asp332, Lys305 y Tyr315 mostró que éstos estaban implicados en la interacción funcional con la TP (Dufour *et al.*, 2000; Dufour *et al.*, 2003). Los residuos Lys305 y Tyr315 se encuentran flanqueando el *loop* del TPR1. La resolución cristalográfica del complejo binario DNA polimerasa/DNA puso de manifiesto la flexibilidad del *loop* ya que en algunas de las copias del complejo este no se resolvió. Por otra parte, en el complejo ternario dicho *loop* estaba bien ordenado adquiriendo una conformación similar a la que presenta en el complejo DNA polimerasa/TP, actuando como una "plataforma" sobre la que se desplazaría el DNA (Berman *et al.*, 2007). Finalmente, la superposición de los complejos binarios con el apoenzima revela cómo el *loop* del TPR1 podría interactuar con el surco mayor del DNA contribuyendo a la estabilización de la estructura DNA polimerasa/DNA durante la polimerización procesiva (Figura 14).

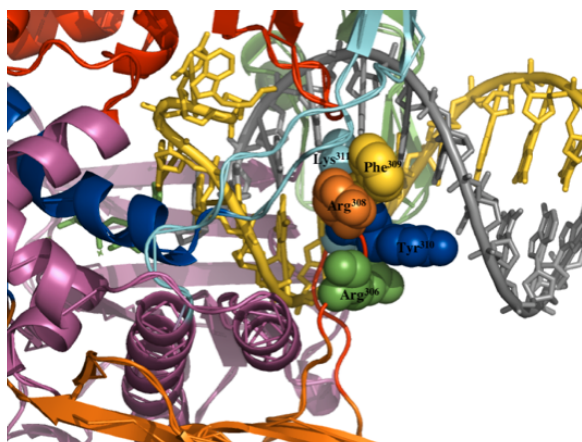


Figura 14. Predicción de la interacción entre los residuos del *loop*, perteneciente al subdominio TPR1 de la DNA polimerasa de $\phi 29$, y el dsDNA en el surco mayor. Cada residuo del *loop* se representa de un color, en forma de esferas. La doble hélice de DNA se representa en gris (cadena iniciadora) y amarillo (cadena molde). El modelo se hizo mediante la superposición de las estructuras del apoenzima y del complejo ternario (Berman *et al.*, 2007). Las coordenadas de la estructura cristalográfica del complejo binario de la DNA polimerasa de $\phi 29$ y el DNA fueron tomadas del PDB 2PZS. La figura se hizo utilizando el software Pymol <http://www.pymol.org>.

2.1. Construcción de las DNA polimerasas mutantes en el subdominio TPR1 de la DNA polimerasa de $\phi 29$

Con el objetivo de confirmar el papel funcional en la interacción con los sustratos TP y DNA de los residuos del *loop* del subdominio TPR1, se llevó a cabo mutagénesis puntual dirigida a los residuos Arg306, Arg308, Phe309, Tyr310 y Lys311 de la DNA polimerasa de $\phi 29$. Todos los residuos se sustituyeron individualmente por Ala, perdiendo la carga positiva en el caso de las Arg (R306A, R308A) y la Lys (K311A) y el anillo aromático en el caso de la Phe (F309A) y de la Tyr (Y310A). También se generó el mutante de delección $\Delta 6$ en el que se eliminaron los residuos Arg306-Lys311, ambos incluidos. Los mutantes fueron sobreexpresados y purificados como se indica en el apartado "Materiales y Métodos".

2.2. Los mutantes Y310A y $\Delta 6$ no mantienen un correcto balance entre las actividades de polimerización y exonucleolisis 3'-5'

En términos enzimáticos, el sustrato óptimo para la actividad exonucleasa 3'-5' de la DNA polimerasa es una molécula de ssDNA. Estudios estructurales previos del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* con un oligonucleótido unido al centro activo exonucleasa mostraron las bases para esta preferencia: al centro activo se llega a través de un canal, presente en el dominio N-terminal, que presenta las dimensiones adecuadas para albergar 3-4 nucleótidos de una cadena simple de DNA (Freemont *et al.*, 1988; Beese y Steitz, 1991). El sustrato fisiológico de una DNA polimerasa es una molécula iniciador/molde (dsDNA), que ha de "abrirse" parcialmente para que el extremo 3'-OH de la cadena iniciadora alcance el centro activo de exonucleolisis. Dicha unión ha de ser lo suficientemente estable para competir con la tendencia de la cadena iniciadora a formar apareamientos de Watson y Crick con la cadena molde, y por otro lado con la estabilización de dicha cadena en el centro activo de polimerización. Por tanto, la importancia de los residuos implicados en la unión del ssDNA en el dominio exonucleasa 3'-5' se pondrá de manifiesto fundamentalmente cuando la actividad exonucleasa se ensaye con una estructura tipo iniciador/molde (Truniger *et al.*, 1996; de Vega *et al.*, 1996)

Para estudiar el balance de las actividades de exonucleolisis 3'-5' y de polimerización se usó como sustrato la molécula híbrida del tipo iniciador/molde sp1/sp1c+6 (15/21mer), marcada en el extremo 5' de la cadena iniciadora. Este sustrato permite evaluar si el equilibrio entre las actividades de polimerización y exonucleolisis 3'-5' ha sido alterado por las mutaciones introducidas en función de la concentración de nucleótidos (Ver Materiales y Métodos). Así, en ausencia de dNTPs, los productos generados darán una estimación de la capacidad exonucleolítica de las DNA polimerasas mutantes. A medida que se aumenta la concentración de nucleótidos se puede analizar cómo compiten ambas actividades.

Como se puede observar en la Figura 15A, a excepción de las proteínas mutantes Y310A y $\Delta 6$, el resto de los mutantes son capaces de incorporar nucleótidos hasta la posición 21 aunque requieren una concentración de dNTPs unas dos veces superior a la DNA polimerasa wild-type. Sólo cuando la concentración de nucleótidos fue de 1 μ M, el mutante Y310A generó una pequeña proporción de productos de elongación de 21mer, mientras que el mutante $\Delta 6$ no fue capaz de introducir los seis nucleótidos hasta concentraciones cercanas a 2 μ M dNTPs. Además, se observa que los mutantes, en general, parecen tener una mayor actividad exonucleolítica que la polimerasa *wild-type* en ausencia de nucleótidos (balance *exo/pol* desplazado hacia la exonucleolisis). Para determinar si esta mayor actividad exonucleasa está impidiendo que la actividad de polimerización llegue a completar la incorporación de los 6 nucleótidos necesarios para alcanzar la posición de 21mer, se realizó el mismo tipo de ensayo eliminando la actividad exonucleolítica de los mutantes mediante la introducción de la doble mutación D12A/D66A en el centro activo de exonucleolisis de cada uno de ellos (Bernad *et al.*, 1989) (Figura 15B). Al

igual que en el caso anterior, los mutantes Y310A^{Exo-} y el $\Delta 6$ ^{Exo-} (Figura 15B) no fueron capaces de generar productos de 21mer hasta alcanzar concentraciones de dNTPs de 5 y 50 nM, respectivamente, mientras que la enzima WT^{Exo-} y el resto de los mutantes fueron capaces de incorporar el sexto nucleótido a una concentración de 1,2 nM dNTPs. Por lo tanto, la disminución en la capacidad de polimerización de los residuos Y310A y el $\Delta 6$, no se debe a un exceso de actividad exonucleolítica, sino a un defecto en la capacidad de síntesis de estas dos polimerasas mutantes.

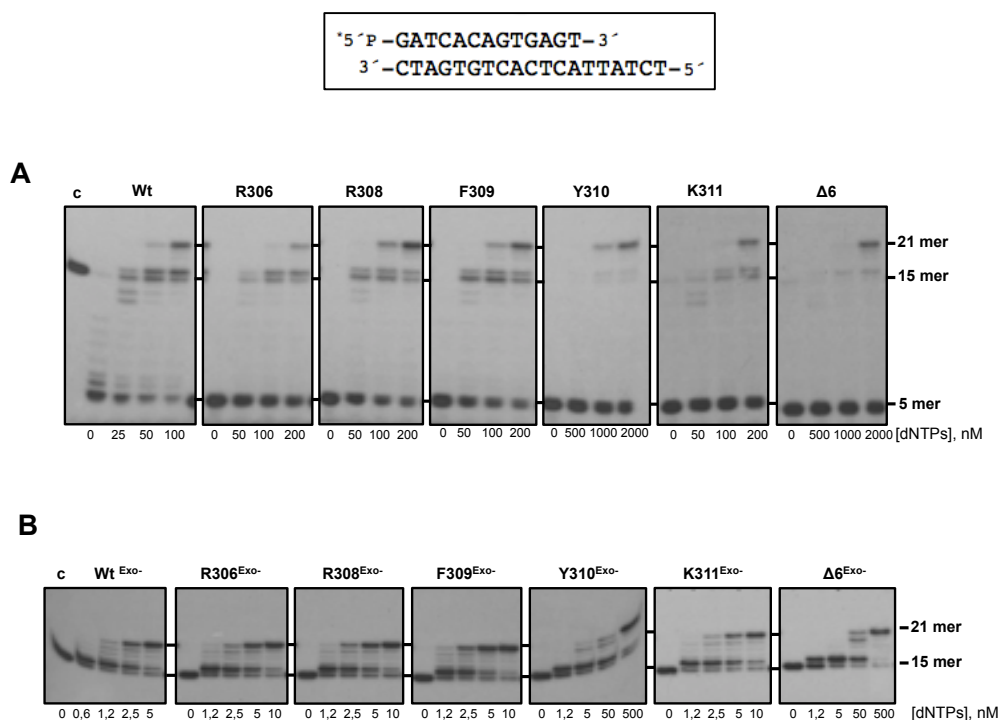


Figura 15. Equilibrio entre las actividades de polimerización y exonucleolisis 3'-5'. *A*, ensayo del balance Exo/Pol de las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes. El ensayo se realizó como se describe en el apartado de Materiales y Métodos, usando la molécula híbrida sp1/sp1c+6 (15/21mer) como DNA iniciador/molde, con las concentraciones indicadas de dNTPs y 10 mM MgCl₂ como metal activador. El asterisco indica que la molécula híbrida está marcada en el extremo 5' de la cadena iniciadora (15mer). La actividad de polimerización o de exonucleolisis 3'-5', se detecta por el aumento o la disminución, respectivamente, del tamaño (15mer) del sustrato marcado. *B*, el análisis de la actividad de polimerización de las DNA polimerasas carentes de actividad exonucleolítica se llevó a cabo como se describe en el apartado A, utilizando como sustrato la molécula híbrida sp1/sp1c+6 marcada, las cantidades indicadas de dNTPs, y como metal activador 10 mM MgCl₂

2.3. Las DNA polimerasas mutantes conservan la integridad de su centro activo de exonucleolisis.

Teniendo en cuenta la mayor actividad exonucleolítica mostrada por las proteínas mutantes (Figura 15 A), quisimos descartar que este hecho fuera debido a una alteración del

centro activo de exonucleolisis provocado por la mutación. Un ensayo para determinar la integridad del centro activo exonucleasa 3'-5' consiste en analizar la hidrólisis del análogo de nucleótido 5'-p-nitrofenil éster de timidina 5'-monosfato (*p*NP-TMP) (ver Materiales y Métodos). Este sustrato presenta un tamaño mínimo de un solo nucleótido y su hidrólisis depende exclusivamente de los residuos catalíticos responsables de la actividad exonucleasa 3'-5', así como de aquellos implicados en la estabilización del nucleótido 3' del ssDNA. Como se puede observar en la Figura 16, todas las DNA polimerasas mutantes presentan una actividad hidrolítica similar a la del enzima *wild-type*. Este resultado indica que el centro activo exonucleasa 3'-5' no ha sufrido diferencias estructurales ni funcionales que pudieran ser responsables de la mayor actividad exonucleolítica sobre DNA observada con los mutantes.

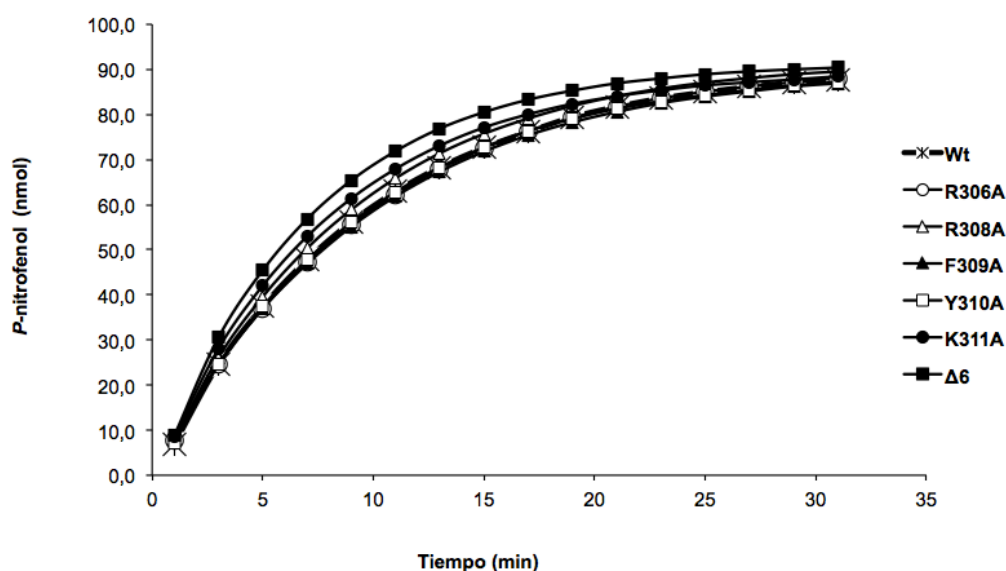


Figura 16. Hidrólisis del 5'-p-nitrofenil éster de timidina 5' monofosfato. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, en presencia de 1 mM MnCl₂, 3 mM *p*NP-TMP y 500 nM de la DNA polimerasa indicada. La hidrólisis se estudió monitorizando espectrofotométricamente a 420 nm la producción de *p*NP que se representa frente al tiempo. Los datos se ajustaron a una hipérbola rectangular mediante regresión lineal por mínimos cuadrados usando el software Kaleidagraph 3.6.4.

2.4. Actividad exonucleasa 3'-5' sobre DNA de las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes.

Como hemos observado en el caso del balance Exo/Pol, las polimerasas mutantes presentaban una actividad exonucleolítica 3'-5' mayor que la del enzima *wild-type*. Para una mejor determinación del grado de alteración de la actividad exonucleolítica se llevaron a cabo ensayos cinéticos utilizando como sustrato tanto DNA de cadena doble como sencilla y en ausencia de nucleótidos (ver "Materiales y Métodos"). Comparando la actividad de los mutantes con la del enzima *wild-type* se puede observar que, en presencia del sustrato de doble cadena (15/21mer), los mutantes Y310A y Δ6, presentan una actividad exonucleasa 3'-5' superior a la

de las demás DNA polimerasas incluida la *wild-type* (164% y 131%, respectivamente; ver Figura 17A y Tabla IV). Debido a que los datos obtenidos con el pNP-TMP demostraban la integridad estructural del centro activo de exonucleolisis, la mayor actividad observada con el dsDNA sugiere que los cambios introducidos en el *loop* provocan una unión preferente del extremo de la cadena iniciadora al centro exonucleasa, en detrimento de su estabilización al centro activo de polimerización, lo que justificaría en parte los problemas de inserción de nucleótidos mostrados por estos mutantes cuando se les elimina la actividad exonucleasa 3'-5' (Figura 15B).

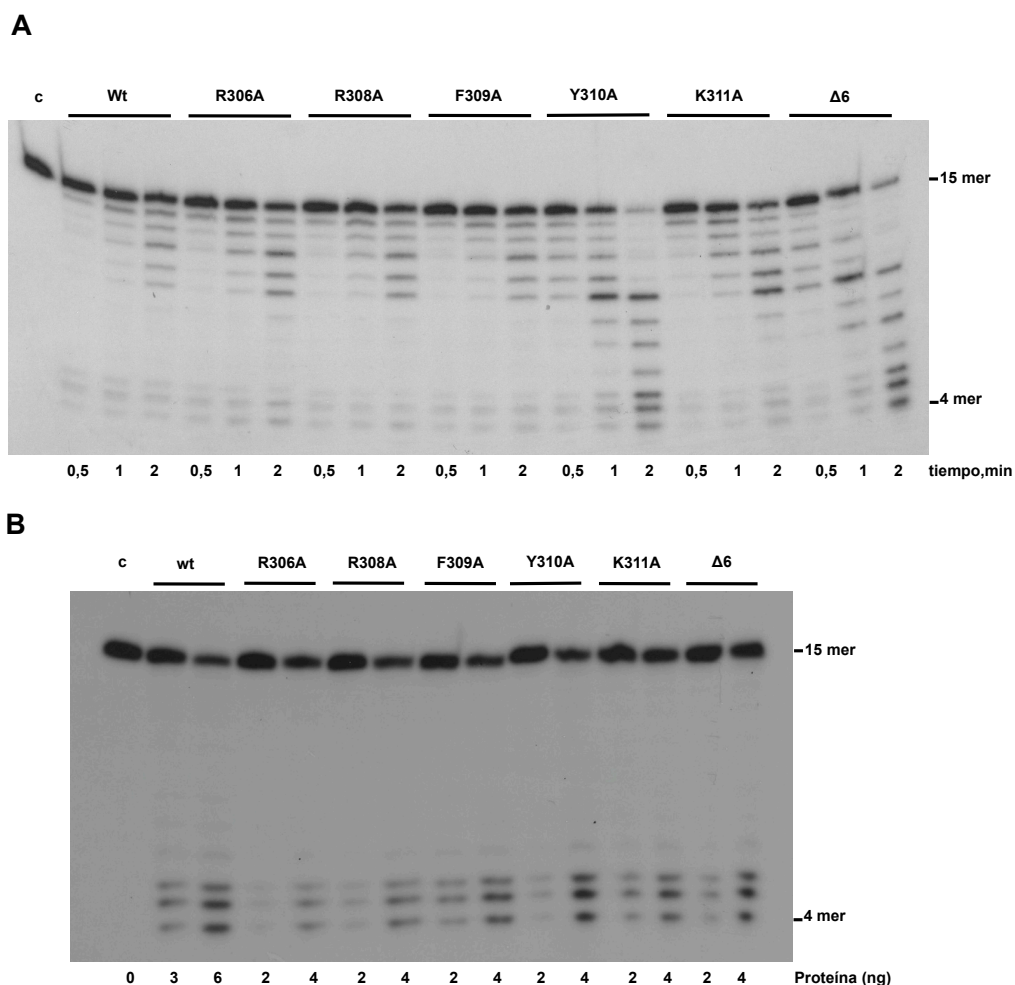


Figura 17. Ensayos de actividad exonucleolítica 3'-5'. *A.* Como molde de DNA se utilizó una molécula del tipo iniciador/molde (sp1/sp1c+6). El ensayo se llevó a cabo tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos, a los tiempos indicados. Se puede observar cómo los mutantes Y310A y Δ6 generan una mayor degradación del sustrato debido a una mayor actividad exonucleolítica 3'-5'. *B.* Ensayo de actividad exonucleolítica sobre ssDNA, utilizando como sustrato la molécula sp1 de 15mer (Materiales y Métodos), con las cantidades de polimerasa, *wild-type* y mutantes, indicadas, durante 1 min. c: control de DNA.

Cuando la actividad exonucleolítica se ensayó utilizando como sustrato de la reacción ssDNA (sp1), mientras que los mutantes R306A y Δ6 mostraron una actividad exonucleolítica similar a la del enzima *wild-type*, los mutantes R308A, K311A, F309A y Y310A presentaron una

actividad 1,4-, 1,4-, 1,6- y 1,6 veces superior al enzima silvestre, respectivamente (ver Figura 17B y Tabla IV). Este resultado sugiere que las modificaciones introducidas en el *loop* favorecen la orientación y/o estabilización del extremo del *primer* en el centro activo exonucleasa 3'-5' incluso en un ssDNA que teóricamente no podría estabilizarse en el centro activo de polimerización.

Tabla IV. Actividad de las DNA polimeresas de $\phi 29$ *wild-type* y mutantes

Ensayo	Sustrato	Mutantes de la DNA polimerasa de $\phi 29$ ^a						
		<i>wild-type</i>	R306A	R308A	F309A	Y310A	K311A	$\Delta 6$
Exonucleolisis	ssDNA	100	102 \pm 8,9	142 \pm 13	161 \pm 11,7	164 \pm 10,1	145 \pm 15,2	116 \pm 7,9
	dsDNA	100	106 \pm 11,2	99 \pm 10,1	90 \pm 6	164 \pm 10,9	108 \pm 6,7	131 \pm 9,2
Replicación de M13	dsDNA	100	92 \pm 4	39 \pm 3,2	87 \pm 6,3	3 \pm 0,4	18 \pm 1,1	n.d.
Amplificación del TP-DNA de $\phi 29$	dsDNA	100	62,1 \pm 12,6	55 \pm 11,7	6,8 \pm 4,3	1,7 \pm 0,4	57,6 \pm 2,7	1,1 \pm 0,1
Iniciación del TP-DNA de $\phi 29$	dsDNA	100	8 \pm 0,6	49 \pm 9	25 \pm 2,1	30 \pm 1,5	100 \pm 18,6	3 \pm 0,9
Interferencia		100	44 \pm 2,3	77 \pm 0,7	21 \pm 1,6	12 \pm 1,4	90 \pm 3,2	2 \pm 0,1
Retarding	ssDNA	100	199 \pm 16,8	230 \pm 25,1	212 \pm 21,1	196 \pm 5,2	243 \pm 17,9	52 \pm 4,5
	dsDNA	100	29 \pm 1,7	30 \pm 2,3	40 \pm 2,2	18 \pm 1	25 \pm 3,1	2 \pm 0,9

^a Los números indican el porcentaje de actividad relativo a la enzima *wild-type* obtenidos de al menos tres experimentos.

2.5. Las DNA polimerasas mutantes transfieren intramolecularmente el extremo de la cadena iniciadora entre sus centros activos de polimerización y exonucleolisis.

La DNA polimerasa de $\phi 29$ posee dos actividades que actúan en direcciones opuestas: polimerización 5'-3' y exonucleolisis 3'-5'. Los datos tanto funcionales como estructurales muestran como los centros activos de ambas actividades residen en dominios estructural y funcionalmente independientes y separados unos 40 Å, que han de actuar de manera coordinada para prevenir la acumulación de errores que puedan producirse durante la replicación del DNA, implicando el movimiento intramolecular del extremo de la cadena iniciadora entre ambos (de Vega *et al.*, 1999). Para determinar si el aumento de la actividad exonucleolítica sobre dsDNA de los mutantes Y310A y $\Delta 6$ es debida a un defecto en la transferencia del extremo 3' de la cadena iniciadora entre los dos centros activos se llevó a cabo un estudio de la capacidad de las DNA polimerasas mutantes de transferir de manera intramolecular la cadena iniciadora desde un centro activo al otro.

Para determinar el tipo de transferencia entre los dos centros activos catalíticos, se analizó la inserción y/o escisión de dNMPs resultantes de un único evento de unión entre la DNA polimerasa y el DNA. Para conseguir estas condiciones se utilizó un exceso molar de DNA competidor. Este exceso de DNA es necesario para atrapar las moléculas de DNA polimerasa que no estén unidas al sustrato de DNA antes de iniciar la reacción, así como para prevenir una reasociación con el sustrato de DNA de aquellas polimerasas que se hayan disociado tras realizar el proceso una vez (ver Materiales y Métodos). Así, si la transferencia desde el centro activo de polimerización al de exonucleolisis en las proteínas mutantes se llevara a cabo tras la disociación del enzima del DNA (transferencia intermolecular), no se observaría actividad exonucleasa sobre el sustrato marcado debido a que el enzima sería atrapado por el exceso de DNA utilizado como competidor, sin poder volverse a unir al sustrato marcado. Por el contrario, si el movimiento de la cadena iniciadora entre ambos centros activos fuera intramolecular, el patrón de actividad de la DNA polimerasa sobre el sustrato habría de ser el mismo tanto en ausencia como en presencia de DNA competidor. Por otro lado, comparando los productos de reacción que se obtengan con las versiones de las proteínas mutantes deficientes en actividad exonucleasa 3'-5' se podrá deducir si ha tenido lugar una reacción exonucleolítica durante el encuentro enzima-DNA.

Para estudiar si la DNA polimerasa es capaz de llevar a cabo el intercambio de la cadena iniciadora desde el centro activo de polimerización al de exonucleolisis, se utilizó como sustrato la molécula híbrida sp1/sp1c+6 (ver Materiales y Métodos), y una pequeña cantidad de [α -³²P]dATP (62 pM) que permita un solo evento de incorporación frente a la timina de la cadena molde (Figura 18A). En estas condiciones, y poniendo un exceso de ssDNA de M13 como competidor (su efectividad se muestra en el carril c), se ensayaron tanto los mutantes simples como sus versiones carentes de actividad exonucleolítica (D12A/D66A) como control de actividad de polimerización. En este caso, los mutantes deficientes en actividad exonucleasa 3'-5' fueron capaces de insertar el dAMP complementario en la primera timina de manera estable (Figura 18A). En el caso de las versiones mutantes con actividad exonucleasa la ausencia de marca es debida a la actividad exonucleolítica de las mismas, que eliminarían el dAMP incorporado. Para comprobarlo, una parte de cada muestra fue sometida a una cromatografía en capa fina en condiciones en las que el dAMP liberado puede separarse de su forma trifosfato y del DNA. Como puede observarse en la Figura 18B, todas las polimerasas con actividad exonucleasa eliminaron el dAMP incorporado aunque el $\Delta 6$ lo hizo en bastante menor medida. Este resultado demuestra que las mutaciones puntuales en el *loop* del subdominio TPR1 no afectan a la transferencia intramolecular de la cadena iniciadora desde el centro activo de polimerización al de exonucleolisis.

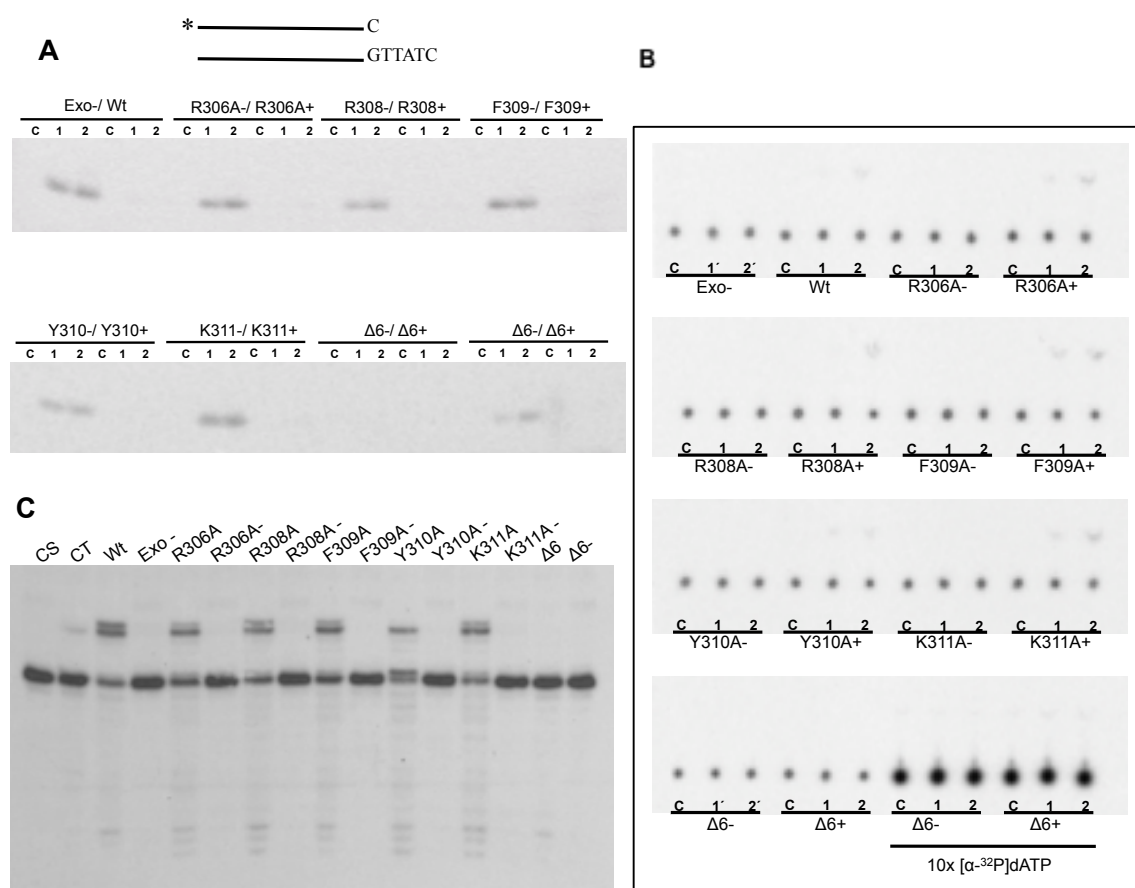


Figura 18. Ensayos de transferencia del extremo del *primer* entre los centros activos. **A.** Ensayo de transferencia del extremo del *primer* desde el centro activo de polimerización al de exonucleólisis 3'-5'. El ensayo fue llevado a cabo como se describe en Materiales y Métodos, utilizando 62 pM dATP marcado, 24 nM de las DNA polimerasas indicadas y 1,2 nM del híbrido sp1/sp1c+6 (mostrado en la parte superior de la figura) no marcado. Las muestras fueron incubadas durante 10 min a 4 °C en presencia (c; control) o ausencia de 70 nM de DNA de M13 de banda simple como competidor. La reacción fue iniciada por la adición del metal activador (c) o metal activador junto con el DNA de M13 (resto de los puntos). Después de incubar a 30 °C en los tiempos indicados, los productos de polimerización fueron analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida 20%-7M urea y posterior autorradiografía. **B.** Análisis de la escisión de dAMP por la actividad exonucleasa 3'-5'. Para este análisis 2 µl de cada muestra del ensayo de incorporación fueron analizados por cromatografía en capa fina (Polygram Cel 300 PEI/UV254) y posterior autorradiografía, como se describe en Materiales y Métodos. **C.** Transferencia del extremo del *primer* desde el centro activo de exonucleólisis al de polimerización. El ensayo fue llevado a cabo como se describe en Materiales y Métodos, utilizando 1,2 nM del híbrido sp1p/sp1c+6 en el que el extremo 3' del *primer* está desapareado y el extremo 5' se encuentra marcado con ³²P, 24 nM de las DNA polimerasas indicadas y 8 µM dNTPs. Las muestras fueron incubadas durante 10 min a 4 °C para permitir la formación del complejo DNA polimerasa-sp1p/sp1c+6, en presencia (CT) o ausencia de 16 µM de DNA de sp1p/sp1c+6 sin marcar como DNA competidor. La reacción fue iniciada por la adición del metal activador (CT) o metal activador junto con el DNA competidor (resto de los puntos). Los productos de polimerización fueron analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida 20%-8 M urea y posterior autorradiografía. Exo-: mutante D12A/D66A. (-) Mutante que porta adicionalmente la doble mutación D12A/D66A para eliminar la actividad exonucleasa 3'-5'. CS. Control sustrato.

Para determinar si la transferencia del extremo de la cadena iniciadora desde el centro activo de exonucleólisis al de polimerización se ve afectado por las mutaciones introducidas, se utiliza un sustrato híbrido que "forzase" a la DNA polimerasa a llevar a cabo un evento exonucleolítico previo a uno subsiguiente de síntesis. Este sustrato es una molécula del tipo iniciador/molde que contiene un desapareamiento G:dGMP (sp1p/sp1c+6; ver Materiales y Métodos) en el extremo 3' de la cadena iniciadora. Para descartar la posibilidad de que los productos de síntesis que se observen sean debidos a una elongación directa del extremo desapareado se realizó el ensayo también con los derivados mutantes deficientes en actividad exonucleasa 3'-5'.

Como podemos observar en la Figura 18C, las versiones mutantes carentes de actividad exonucleasa 3'-5' no elongaron el extremo desapareado del iniciador, lo que garantiza que los productos de síntesis observados con las versiones con actividad exonucleasa son el resultado de una primera eliminación exonucleolítica del extremo desapareado seguida de la adición de nucleótidos al extremo 3'-OH del iniciador, ahora ya perfectamente apareado. Debido a que el ensayo se realizó en presencia de DNA competidor, los resultados indican que el extremo de la cadena iniciadora se transfiere desde el centro exonucleasa al de polimerización de manera intramolecular sin que se produzca la disociación del enzima del DNA. En el caso del mutante de delección $\Delta 6$, la ausencia de productos tanto de degradación como de síntesis indica la débil interacción que dicha polimerasa tiene con el DNA.

2.6. Las DNA polimerasas mutantes interaccionan preferentemente con sustratos de banda simple.

Para estudiar la capacidad de los mutantes de reconocer y unirse a los diferentes tipos de sustratos de manera eficiente, se hicieron ensayos de retraso en gel. Para ello empleamos sustratos de cadena doble (sp1/sp1c+6) y de cadena sencilla (sp1). Con este tipo de sustrato se obtiene una única banda de retraso que se ha interpretado como un complejo enzima/DNA en el que el extremo del *primer* está estabilizado en el centro activo de polimerización y en el de exonucleólisis, respectivamente (Méndez *et al.*, 1994). Como se observa en la Figura 19A, en general, los mutantes se unen de manera menos eficiente al sustrato de cadena doble que el enzima *wild-type*. Cuando se utiliza ssDNA (sp1) como sustrato, todos los mutantes, a excepción del $\Delta 6$, presentan valores de unión superiores a los del enzima *wild-type* (Figura 19B) y en todos ellos la estabilización al centro activo exonucleasa 3'-5' está favorecida con respecto a la estabilización del extremo del *primer* al centro activo de polimerización (Figura 19 B). Estos resultados parecen sugerir que las mutaciones introducidas en el *loop* del subdominio TPR1 de la DNA polimerasa desestabilizan la interacción del extremo de la cadena iniciadora al centro de polimerización, favoreciendo la estabilización del extremo de la cadena iniciadora en el centro

activo exonucleasa 3'-5', lo que justificaría la mayor actividad degradativa observada por los mutantes en los ensayos de exonucleólisis.

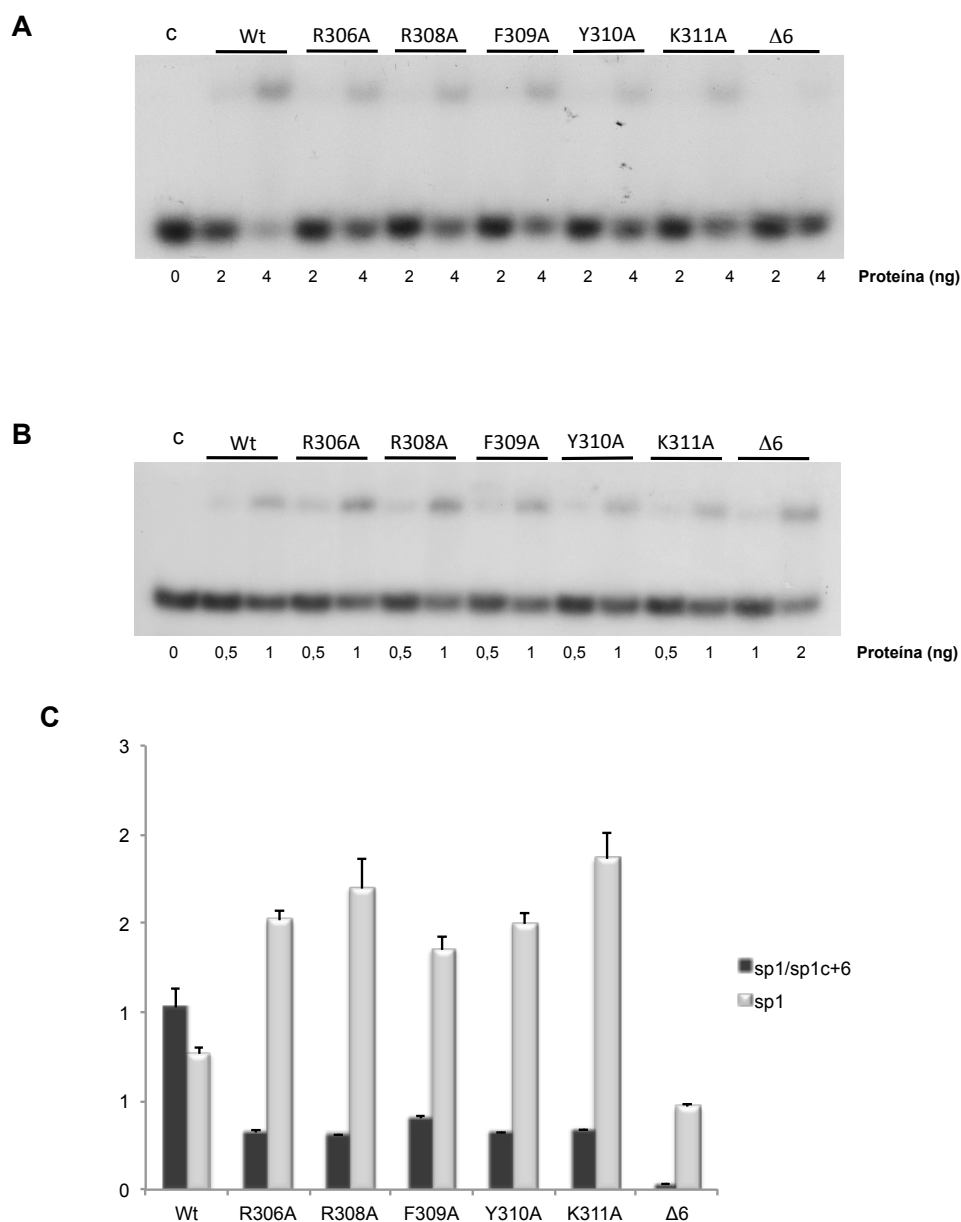


Figura 19. Ensayos de retraso en gel con los diferentes sustratos de DNA. Los ensayos de retraso en gel se llevaron a cabo como se describe en el apartado de Materiales y Métodos, utilizando las cantidades indicadas en cada caso de DNA polimerasa *wild-type* y mutantes, usando como sustrato de DNA la molécula tipo molde/iniciador (sp1/sp1c+6; **A**) y ssDNA (sp1; **B**). Tras una electroforesis en condiciones no desnaturizantes, la movilidad del DNA libre o del complejo DNA polimerasa/DNA se detectó mediante autorradiografía. El carril c corresponde a la movilidad del dsDNA (**A**) y ssDNA (**B**) en ausencia de DNA polimerasa. **C**. Representación de los valores obtenidos en los ensayos de retraso en gel usando como sustratos DNA de doble cadena o DNA de cadena simple. Todos los datos están normalizados a partir del valor obtenido por la polimerasa *wild-type* con el sustrato de doble cadena al que se le asigna el valor 1.

2.7. La DNA polimerasa mutante Y310A tiene afectada su actividad de replicación del DNA de M13

Teniendo en cuenta las deficiencias en la unión del DNA de cadena doble y el cambio de algunos mutantes en el equilibrio *exo/pol*, se determinó la capacidad de llevar a cabo una polimerización procesiva acoplada al desplazamiento de banda. Para ello se utilizó como molde el ssDNA circular de M13 al que se ha hibridado el oligonucleótido universal cuyo extremo 3' puede ser utilizado por la DNA polimerasa como iniciador de la replicación. La DNA polimerasa *wild-type* es capaz de replicar la totalidad del DNA y proseguir la replicación desplazando la cadena de DNA recién sintetizado (replicación tipo círculo rodante). Como se puede observar en la Figura 20, a excepción del mutante de delección $\Delta 6$ que no generó ningún producto de replicación detectable, todos los mutantes fueron capaces de llevar a cabo la polimerización acoplada al desplazamiento de banda ya que generaron productos de replicación de mayor longitud que el DNA unidad (7 kb). Mientras que la eficiencia de la replicación de los mutantes R306A y F309A fue similar a la actividad observada en la *wild-type* (92% y 87%, respectivamente), la de los mutantes R308A, Y310A y K311A fue 3-, 33- y 6 veces inferior a la del enzima *wild-type*, respectivamente (Tabla IV). A diferencia del resto de los mutantes, el Y310A también mostró defectos en la velocidad de la replicación, como se puede deducir del menor tamaño de los productos sintetizados.

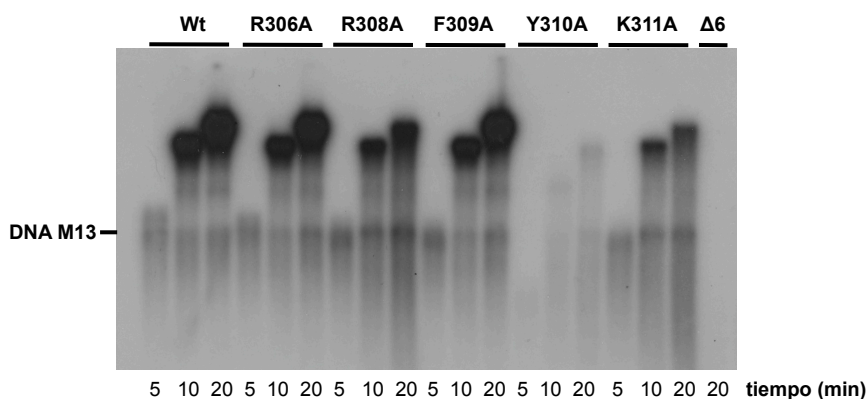


Figura 20. Replicación del DNA de M13 acoplado a desplazamiento de banda por las DNA polimerasas de $\phi 29$ mutadas en el *loop* del subdominio TPR1. La replicación del DNA de M13 primado se llevó a cabo tal y como se explica en el apartado de Materiales y Métodos, usando 40 μM dNTPs, 60 nM de DNA polimerasa de $\phi 29$ *wild-type* o mutante y 10 mM MgCl_2 como metal activador. Tras incubar los tiempos indicados a 30 $^{\circ}\text{C}$, la longitud del DNA de M13 sintetizado fue analizada mediante electroforesis en gel alcalino de agarosa al 0,7 % y posterior autorradiografía. La posición del tamaño unidad del DNA de M13 está indicada a la izquierda.

Las proteínas mutantes Y310A y $\Delta 6$ han presentado deficiencias tanto en unión al DNA (ensayos de retraso en gel) como en actividad de replicación con M13, además de ver alterado su balance *exo/pol* hacia la actividad exonucleolítica. Todo esto apunta a que, tanto el *loop* ($\Delta 6$) como en particular el residuo Tyr310, son esenciales para la estabilización del extremo de la cadena iniciadora al centro activo de polimerización.

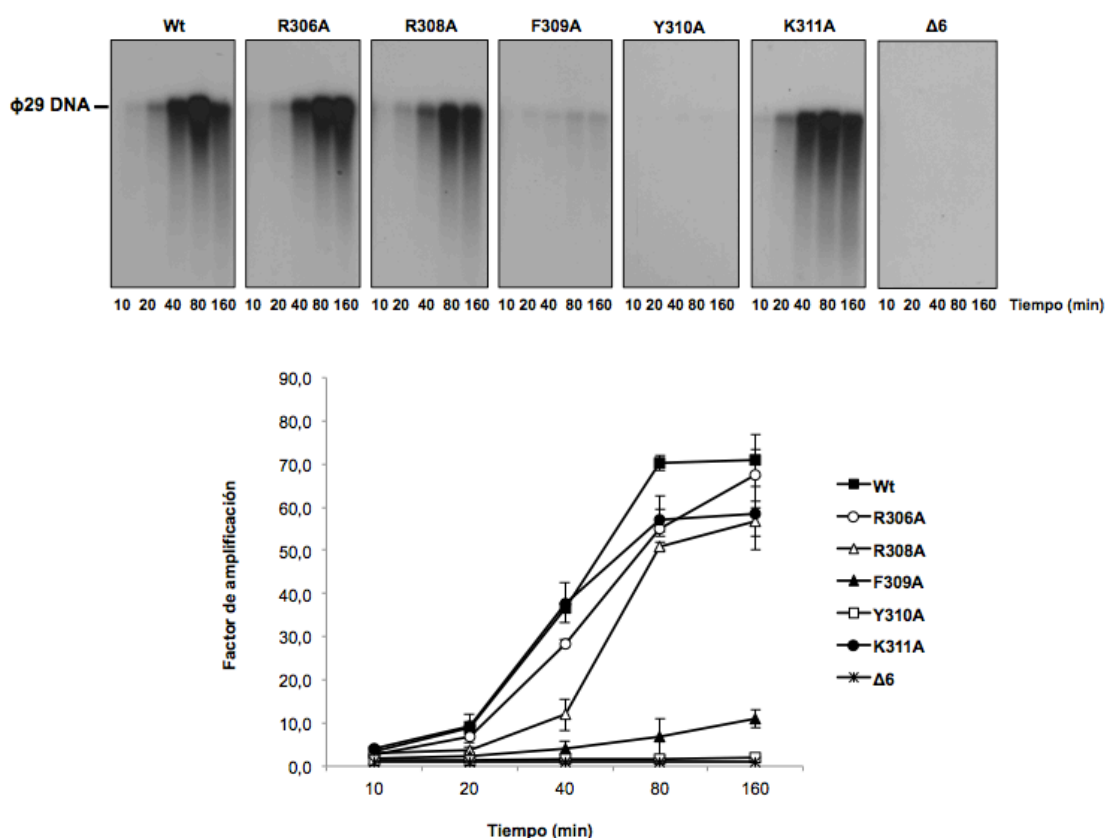


Figura 21. Amplificación del TP-DNA de $\phi 29$. En la parte superior se muestra el ensayo de amplificación, el cual se realizó como se describe en Materiales y Métodos, en presencia de 16 pM de TP-DNA, 3 nM de DNA polimerasa, 6 nM de TP y 30 μ M tanto de $\phi 29$ SSB como de DBP. Las muestras se incubaron a 30 °C durante los tiempos indicados. La longitud del TP-DNA sintetizado fue analizada mediante electroforesis en gel alcalino de agarosa al 0,7% y posterior autorradiografía. Se indica la altura a la que migra el tamaño unidad del $\phi 29$ DNA a la izquierda de la figura (19.285 pb). En la parte inferior se muestra la gráfica donde se calcula el factor de amplificación obtenido con las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes.

2.8. Los mutantes F309A y Y310A tienen disminuida su capacidad de amplificación del TP-DNA de $\phi 29$.

En este tipo de ensayo se utilizan condiciones similares a las que emplea el bacteriófago *in vivo*. La reacción se lleva a cabo en presencia de DNA polimerasa, TP, cantidades limitantes de $\phi 29$ TP-DNA y las proteínas de $\phi 29$ de unión a ssDNA y a dsDNA. Esta reacción permite

amplificar hasta tres órdenes de magnitud una cantidad limitante de TP-DNA inicial (Blanco *et al.*, 1994). Aquí, la TP iniciadora acaba unida covalentemente a los extremos 5' del DNA recién sintetizado, actuando como TP paterna en la siguiente ronda de replicación.

Como se puede observar en la Figura 21, en el tiempo de 80 min, cuando la *wild-type* presenta un factor de amplificación constante de aproximadamente 75, los mutantes R306A, R308A y K311A muestran un factor de amplificación de entre 50-60. Incluso, el mutante R306A sigue aumentando su factor de amplificación hasta niveles de la *wild-type*. Cabe destacar que el mutante F309A, a pesar de mostrar una eficiente replicación con el sustrato de DNA de M13, apenas muestra síntesis con el DNA de ϕ 29. Los mutantes Y310A y Δ 6 presentan muy poca actividad (2% y 1%, respetivamente, de la actividad que presenta la *wild-type*), al igual que se ha visto en presencia de M13, por lo que no influye en su actividad el tipo de sustrato utilizado. Sin embargo, el mutante K311A que en el ensayo de replicación de M13 presentaba una actividad del 18% con respecto a la *wild-type*, en el caso de la amplificación del DNA de ϕ 29 la proporción con respecto a la *wild-type* aumenta hasta un 58%, recuperando parte de la actividad.

2.9. Las DNA polimerasas mutantes R306A, F309A, Y310A y Δ 6 muestran defectos en la reacción de iniciación de la replicación del TP-DNA.

Como se ha podido observar en el ensayo de amplificación, algunos mutantes presentan muy poca actividad de síntesis con respecto a la actividad mostrada por la enzima *wild-type* (Figura 21). Para que tenga lugar el proceso de replicación del DNA de ϕ 29, la DNA polimerasa debe formar un complejo con una molécula de TP libre. Este heterodímero reconoce el origen de replicación situado en cada uno de los extremos del genoma lineal, y la DNA polimerasa cataliza la incorporación dirigida por molde del 5' dAMP iniciador al grupo hidroxilo de la Ser232 de la TP (reacción de iniciación). Para determinar la eficiencia de los mutantes del *loop* del subdominio TPR1 en el proceso de iniciación, se estudió la capacidad de éstos para formar el complejo TP-dAMP, usando como sustrato el TP-DNA de ϕ 29. En la Figura 22 se puede ver cómo, a excepción de los mutantes K311A y el R308A que presentaron una actividad similar a la de la polimerasa *wild-type*, el resto de los mutantes presentan una eficiencia menor en la iniciación de la replicación del TP-DNA. El mutante R306A, que en el ensayo de amplificación presentaba niveles elevados de actividad (62%), en la iniciación muestra niveles del 8% de la actividad del enzima silvestre (Tabla IV). Este resultado probablemente esté indicando problemas de afinidad del mutante por el nucleótido entrante, ya que la concentración de dNTPs y dATP en los ensayos de amplificación e iniciación son de 80 μ M y 0,2 μ M, respetivamente. El mutante F309A también presenta una baja actividad durante la iniciación (25%) que justificaría los defectos observados con este mutante en la amplificación del TP-DNA. El mutante Y310A muestra un 30% de actividad de iniciación. La baja capacidad de amplificación (2%) podría ser debida a que

a los problemas de iniciación se le suma su baja eficiencia de síntesis de DNA (ver ensayo de replicación de M13). El mutante $\Delta 6$ presenta niveles casi no detectables de actividad de iniciación, que justifican la ausencia de productos de amplificación. Este resultado podría estar indicando que al igual que lo que ocurría con sustratos de DNA, el mutante puede ser deficiente en la interacción con la TP.

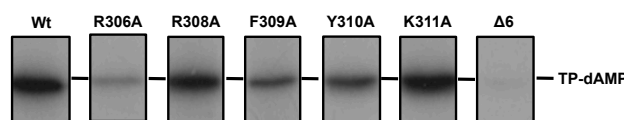


Figura 22. Ensayos de iniciación de la replicación del TP-DNA de $\phi 29$ por las DNA polimerasas mutantes de $\phi 29$ del subdominio TPR1. Reacción de iniciación con molde en presencia de Mg^{2+} . El ensayo de iniciación fue llevado a cabo tal y como se describe en el apartado Materiales y Métodos en presencia de 18 nM de DNA polimerasa *wild-type* o mutante, 18 nM de TP, y 10 mM $MgCl_2$ como metal activador. Tras incubar 4 min a 30 °C, las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE y posterior autorradiografía. A la izquierda de la figura se indica la posición a la que migra el complejo de iniciación TP-dAMP.

2.10. Las DNA polimerasas mutantes R306A, F309A, Y310A y $\Delta 6$ exhiben una interacción deficiente con la TP

Es necesaria una unión estable y funcional entre la DNA polimerasa y la TP para que el proceso de replicación sea llevado a cabo de manera satisfactoria. Si esta interacción no se produce o es inestable, se producirán defectos en el proceso replicativo que pueden ir de leves, a la ausencia de producto replicado. Hemos visto cómo algunos de los mutantes presentan deficiencias en la iniciación de la replicación del TP-DNA de $\phi 29$. Mediante ensayos de interferencia se analizó si esta disminución en la actividad se debía a defectos en unión a la TP. En este tipo de ensayo las DNA polimerasas, tanto *wild-type* como los mutantes en el *loop* del subdominio TPR1, compiten por una cantidad limitante de TP con la DNA polimerasa mutante D249E que es catalíticamente inactiva pero mantiene intacta la capacidad de interacción con la TP (Blasco *et al.*, 1993a). Así, si la capacidad de interacción de las polimerasas mutantes con la TP no estuviera afectada se obtendría una inhibición del 50% de la capacidad de iniciación cuando la relación enzima mutante/D249E fuera 1/1, como es el caso de la DNA polimerasa *wild-type* y de los mutantes R308A y K311A (ver Figura 23). Por el contrario, el hecho de obtener una inhibición de la actividad de iniciación superior al 50% en los mutantes $\Delta 6$, Y310A, F309A y R306A cuando se ensayan en presencia de la misma concentración de polimerasa D249E sugieren que la capacidad de interacción de dichos mutantes con la TP está afectada.

Estos datos siguen en consonancia con lo visto hasta ahora en los ensayos en los que está presente la TP como sustrato, siendo los mutantes K311A y R308A los que mejor iniciación y

amplificación del TP-DNA de $\phi 29$ han mostrado, mientras que los mutantes $\Delta 6$ e Y310A son los más afectados en todos los ensayos de replicación realizados. Por otro lado, el mutante R306A, a pesar de su reducida actividad de iniciación con respecto a la *wild-type* (8%), retiene una capacidad de interacción con la TP y de amplificación del TP-DNA del 44% y 62%, respectivamente, respecto al enzima *wild-type*. Este resultado podría sugerir un papel para este residuo en la estabilización/orientación de la Ser232 en el centro activo de polimerización durante la reacción de iniciación sin influir en la estabilidad del complejo DNA polimerasa/TP. Como se ha comentado anteriormente, el hecho de que mejore considerablemente la capacidad del mutante R306A de amplificar el TP-DNA, a pesar de la deficiente reacción de iniciación, podría estar sugiriendo que los problemas de estabilización del grupo OH- de la Ser232 de la TP se traducen en problemas de afinidad por nucleótido, siendo patentes en la reacción de iniciación (0,2 μ M dATP) y superados en la de amplificación (80 μ M dNTPs)

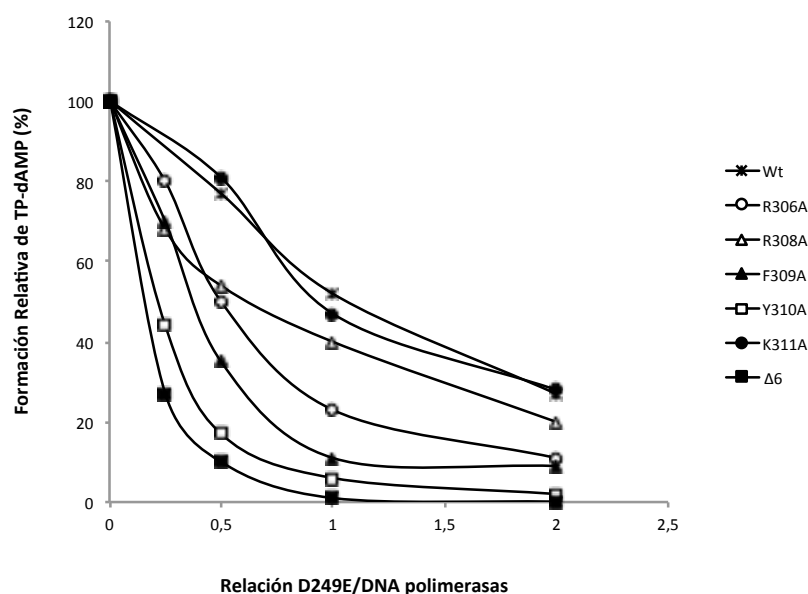
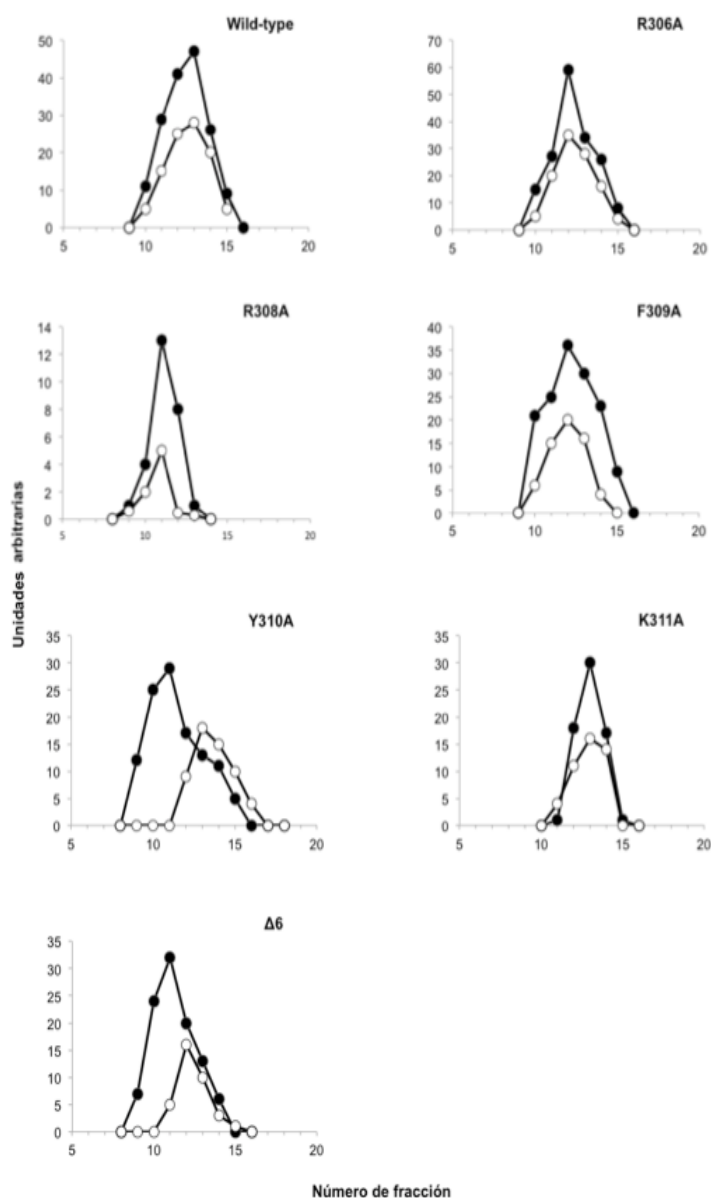


Figura 23. Ensayo de interferencia por la unión con la TP de las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, usando una cantidad limitante de TP, cantidades fijas de cada DNA polimerasa *wild-type* o mutante y cantidades crecientes de la DNA polimerasa mutante D249E. En la gráfica se indica el TP-dAMP formado en las diferentes condiciones de competición con respecto al formado en ausencia de competición (100%).

Los ensayos de interferencia han mostrado cómo gran parte de las mutaciones introducidas en el *loop* del subdominio TPR1 de la DNA polimerasa disminuyen su capacidad de interacción estable con la TP en diferente medida, apuntando a que este *loop* puede ser importante en el establecimiento de las interacciones con la TP necesarias para llevar a cabo la formación de un heterodímero estable y funcional.

Para confirmar los resultados obtenidos en los ensayos de interferencia, la interacción de las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes con la TP se analizó directamente por

ultracentrifugación en gradiente de glicerol, como se describe en Materiales y Métodos. Tanto la enzima *wild-type*, como la mayoría de los mutantes, formaron un heterodímero de 97 kDa con la TP, cosedimentando ambas proteínas en las mismas fracciones (Figura 24). Sin embargo, la DNA polimerasa y la TP sedimentaron independientemente como monómeros en el caso de las DNA polimerasas mutantes Y310A y $\Delta 6$, dos de los mutantes que peor se unían a la TP en el ensayo de interferencia.



2.11. Las DNA polimerasas mutantes no muestran defectos en la etapa de transición de la replicación del TP-DNA

Otro paso de la replicación del TP-DNA susceptible de presentar alteraciones por las mutaciones introducidas en las DNA polimerasas es la transición. Esta etapa sigue a la iniciación

y durante la cual la DNA polimerasa continúa introduciendo nucleótidos mientras sigue formando un complejo con la TP. La disociación de ambas proteínas ocurre tras la incorporación del décimo nucleótido, momento a partir del cual comienza la etapa de la elongación en la que la misma molécula de DNA polimerasa lleva a cabo de manera procesiva y acoplada a desplazamiento de cadena la replicación total del DNA de $\phi 29$ (Méndez *et al.*, 1997). Como se ha visto en los ensayos de amplificación, algunos de los mutantes presentan una actividad de síntesis inferior a la del enzima *wild-type*, por lo que además de analizar el proceso de iniciación también se analizó la etapa de transición para determinar si los enzimas mutantes presentan problemas a la hora de llevar a cabo este paso. Con tal propósito realizamos un ensayo de elongación truncada utilizando los mutantes carentes de actividad exonucleolítica (ver Materiales y Métodos). Se analizaron los productos de reacción obtenidos tras llevar a cabo una replicación en presencia de los nucleótidos indicados (Figura 25). Proporcionando dATP como único nucleótido la DNA polimerasa WT^{Exo-} da lugar a los productos TP-dAMP y TP-(dAMP)₃. En presencia de los nucleótidos dATP, dTTP y dGTP, la DNA polimerasa WT^{Exo-} replica hasta la posición octava cuando la replicación comienza desde el origen derecho del genoma del bacteriófago. Con los 4 dNTPs se observa también una banda en la posición 16. En el caso de los mutantes, si bien las intensidades de las bandas correspondientes a los diferentes productos de elongación estarían en correlación con sus niveles de iniciación, todos ellos fueron capaces de llevar a cabo la transición entre la iniciación con TP y la elongación con DNA con una eficiencia similar a la mostrada por el enzima *wild-type*, ya que el patrón de bandas obtenido fue el mismo. En el caso del mutante de delección su incapacidad de llevar a cabo la reacción de iniciación no permitió determinar su eficiencia en la fase de transición.

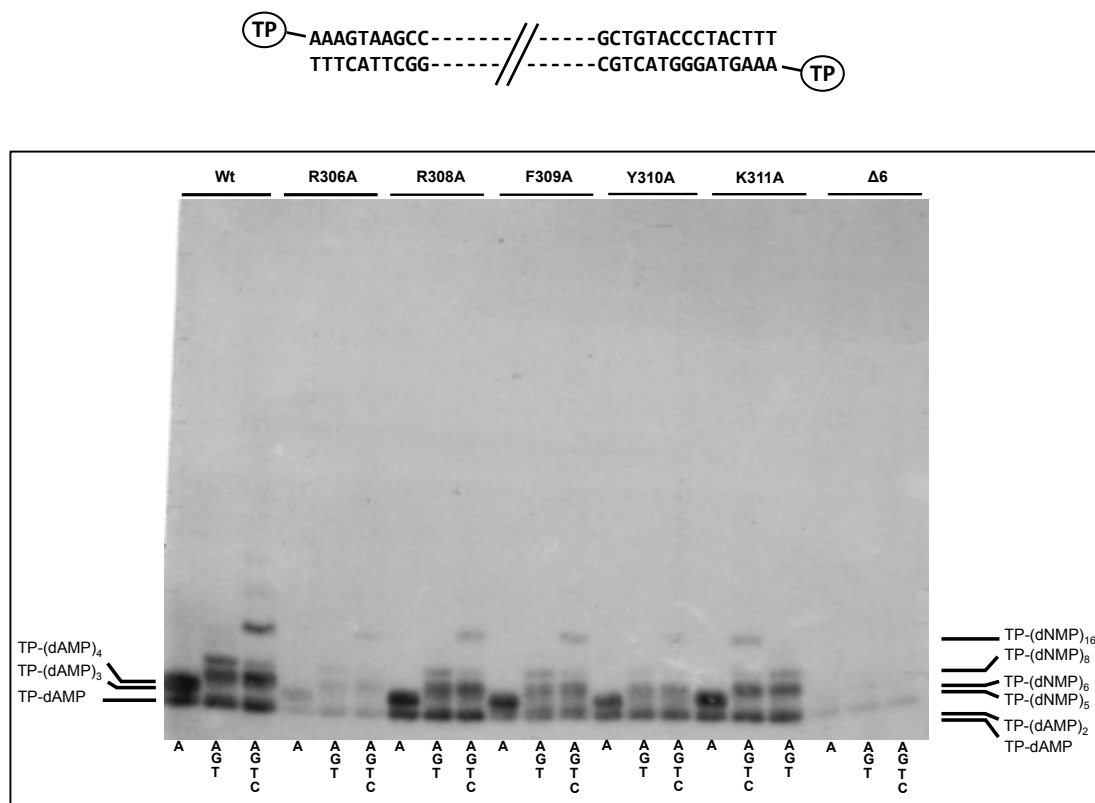


Figura 25. Análisis de los productos de transición generados durante el proceso de replicación de $\phi 29$ TP-DNA. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando 13 nM TP, 13 nM de DNA polimerasa *wild-type* o mutante y 5 μ M de los dNTPs indicados en cada caso. Tras incubación 5 min a 30 °C, los productos de transición obtenidos se analizaron por SDS-PAGE de alta resolución. En la figura se indica la longitud de los diferentes productos de transición.

DISCUSIÓN

1. Importancia del motivo LExE en el correcto posicionamiento del nucleótido entrante

1.1. Papel estructural de los residuos Gly481 y Trp483 del motivo LExE en la formación de un "bolsillo" hidrofóbico que acoge al dNTP entrante

Estudios previos donde se compararon secuencias de varias DNA polimerasas identificaron tres residuos carboxílicos conservados en el subdominio *palm*, responsables de la catálisis de la formación del enlace fosfodiéster (Joyce y Steitz, 1994; Arnold *et al.*, 1995; Steitz *et al.*, 1994). Esos residuos aminoacídicos, identificados en la mayoría de las DNA polimerasas, se hallan formando parte de dos motivos diferentes: el motivo A, que contiene un aspártico, y el motivo C, donde se encuentran los otros dos residuos aminoacídicos (Delarue *et al.*, 1990; Joyce, 1997; Patel *et al.*, 2001a; Poch *et al.*, 1989). En todas las estructuras tridimensionales conocidas de las DNA polimerasas, estos tres residuos aminoacídicos de los motivos A y C se encuentran juntos formando la llamada "triada catalítica", puesto que los tres están implicados en la unión inicial del metal divalente en el centro activo de polimerización. La resolución posterior de estructuras ternarias de varias DNA polimerasas demostraron que los iones catalíticos A y B están coordinados exclusivamente por el aspartato del motivo A y por uno de los aspartatos del motivo C (Wang *et al.*, 1997).

Estudios estructurales y bioquímicos llevados a cabo con la DNA polimerasa de $\phi 29$ demostraron que junto a estos residuos actuaba también el grupo carbonilo de la Val250, perteneciente al motivo A (motivo DVNSLYP), interaccionando con el fosfato γ del nucleótido entrante, a través de su coordinación con el metal B (Berman *et al.*, 2007; Pérez Arnaiz *et al.*, 2010). De manera similar, estudios estructurales llevados a cabo con la DNA polimerasa de *Thermococcus gorgonarius* y la DNA polimerasa del bacteriófago RB69 mostraron que el grupo carbonilo de los residuos correspondientes, Phe405 y Leu412, respectivamente, se encuentran también coordinando el ion metálico B (Franklin *et al.*, 2001; Zakharova *et al.*, 2004; Hopfner *et al.*, 1999). Por tanto, independientemente de la cadena lateral, la interacción entre un grupo carbonilo y el complejo dNTP-metal B parece encontrarse conservada en el centro activo de polimerización de las DNA polimerasas de la familia B. La cadena lateral del residuo Val250 de la DNA polimerasa de $\phi 29$ se adentra en una cavidad estructural formada por los residuos Leu253 (del motivo DVNSLYP) y los residuos Gly481 y Trp483 (pertenecientes al motivo LExE estudiado durante este trabajo; ver Figura 8B y Figura 26). En el resto de DNA polimerasas de la familia B, la correcta orientación del grupo carbonilo de los residuos de Phe/Tyr del motivo D(F/Y)xSLYP (homólogo al residuo Val250 en las DNA polimerasas que inician con proteína terminal) está garantizada gracias al empaquetamiento de los residuos Ile o Leu del motivo LExE (en letras negras sobre fondo gris en el alineamiento mostrado en la Figura 7. Ver también Figura 26). Por tanto, mientras que el acortamiento de la cadena lateral en el mutante W483L podría provocar una alteración en la colocación correcta del grupo carbonilo de la Val250, el cambio

introducido en el residuo Glu481 a fenilalanina podría presentar impedimentos estéricos con la Val250, aunque en este último caso la actividad reducida no nos permite discernir entre esta posibilidad o un mal plegamiento de la proteína. Lo más probable es que estos impedimentos estéricos lleven a una distorsión de la estructura espacial del grupo carbonilo de la Val250, lo que provocaría la disminución de la eficiencia catalítica en la inserción del nucleótido entrante, la mayor incorporación de nucleótido erróneo y la disminución en la actividad pirofosforolítica observada en los mutantes Gly481 y Trp483. El hecho de la recuperación parcial de estas actividades en presencia del ión metálico Mn^{2+} por parte de los mutantes Gly481 y Trp483 puede deberse al mayor radio iónico del ión Mn^{2+} (0,8 Å) frente al del Mg^{2+} (0,66 Å) ya que podría restablecer la interacción entre la Val250 y el nucleótido entrante. Todos estos resultados nos permiten concluir que el papel principal del conjunto formado por Val250, Leu253, Gly481 y Trp483 podría ser el mantenimiento de la orientación correcta del residuo Val250 con respecto al metal B para estabilizar el estado reactivo de los fosfatos β y γ de los dNTP entrantes (Steitz, 1998).

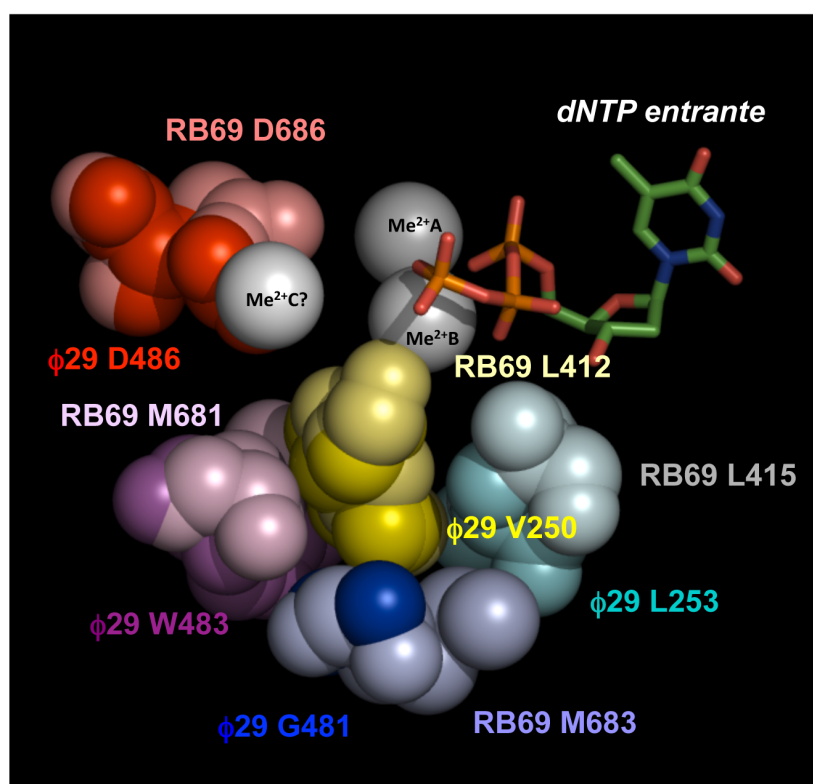


Figura 26. Superposición de la cavidad estructural formada por los residuos del motivo LEXE de las DNA polimerasas de $\phi 29$ y RB69. Los residuos del motivo LEXE están representados como esferas y el nucleótido entrante con varillas. Los iones metálicos A y B y el ion que proponemos como C están representados como esferas grises. Los datos cristalográficos correspondientes a las DNA polimerasas de $\phi 29$ y RB69 proceden del *Protein Data Bank* código 2PYL (Berman *et al.*, 2007) y 1IG9 (Franklin *et al.*, 2001), respectivamente. Las figuras se hicieron con el programa PyMOL.

1.2. El residuo Glu486 de la DNA polimerasa de $\phi 29$ podría estar interaccionando con un tercer ion metálico no catalítico.

Como se ha dicho anteriormente, el motivo LExE se caracteriza por tener un residuo Glu invariable en todos los miembros de DNA polimerasas de la familia B (Braithwaite e Ito, 1993). Estudios cristalográficos de la DNA polimerasa del bacteriófago RB69 muestran que junto a la rotación del *finger*, necesaria para mantener al dNTP entrante en el sitio activo, se produce una reorientación de la cadena lateral del Glu686 (homólogo al Glu486 de la DNA polimerasa de $\phi 29$). Este movimiento permite al residuo Glu686 interaccionar con el ion metálico no catalítico C, el cuál contacta de manera indirecta con el fosfato γ del dNTP entrante a través de una molécula de agua (Franklin *et al.*, 2001; Zakharova *et al.*, 2004; Shamoo y Steitz, 1999). Se ha propuesto que esta interacción podría ayudar al posicionamiento correcto del dNTP en una conformación catalíticamente competente para ser atacado por el grupo 3'-OH del *primer* durante la formación del enlace fosfodiéster (Zakharova *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos apoyan esta hipótesis. Hemos demostrado que las mutaciones introducidas en el residuo Glu486 de la DNA polimerasa de $\phi 29$ hacen disminuir la velocidad de replicación en presencia de Mg^{2+} como metal activador, posiblemente causado por una disminución en la afinidad por el dNTP entrante. Al igual que en el caso de los residuos que formaban la cavidad estructural antes mencionada (Gly481 y Trp483 del LExE, junto al residuo Leu253 del motivo Dx₂SLYP), la presencia de Mn^{2+} aumenta drásticamente todas las actividades sintéticas de los mutantes en el residuo Glu486, apoyando para este residuo un papel en la unión a metal. Esta recuperación de la actividad en presencia del ión Mn^{2+} , que podría deberse al mayor radio iónico de este metal con respecto al Mg^{2+} , ya se ha observado anteriormente en la Pol β , donde en presencia de Mg^{2+} la interacción se produce con los fosfatos β y γ del dNTP, mientras que en presencia de Mn^{2+} los contactos se generan con los fosfatos α y γ del dNTP entrante (Pelletier *et al.*, 1996). El mutante E686A de la DNA polimerasa de RB69 exhibió un fenotipo muy similar al presentado por el residuo Glu486 de la DNA polimerasa de $\phi 29$, viéndose una disminución en la actividad de polimerización con Mg^{2+} que aumentó hasta niveles *wild-type* en presencia de Mn^{2+} (Zakharova *et al.*, 2004).

El papel del motivo LExE garantizando que puedan ocurrir los contactos adecuados con el fosfato γ del dNTP entrante, o bien a través del metal B (gracias a los residuos Gly481 y Trp483 de la DNA polimerasa) o por medio del potencial metal C (gracias al residuo Glu486 de la DNA polimerasa), se apoya por la deficiencia en la actividad pirofosforolítica mostrada por los mutantes en estas posiciones cuando se utiliza Mg^{2+} como metal activador.

Un parámetro relevante en la medida de la fidelidad de una DNA polimerasa es la relación entre la eficiencia catalítica en la inserción del nucleótido correcto e incorrecto (Creighton *et al.*, 1995). Como se mencionó en el apartado de "Resultados", el valor de

discriminación obtenido para la mayoría de los mutantes fue menor que el valor mostrado para la polimerasa *wild-type*. Teniendo en cuenta estos datos se puede especular con la posibilidad de que el motivo LExE contribuya a discriminar contra un apareamiento de bases incorrecto.

La estructura tridimensional de la DNA polimerasa de *T. gorgonarius*, perteneciente a la familia B, también apoya el papel como ligando de metal del segundo Glu del motivo LExE (Hopfner *et al.*, 1999). En este caso, los dos residuos de Glu (Glu578 y Glu580) forman un sitio de unión inesperado para Mn^{2+} y Zn^{2+} . Su proximidad al Aps404 catalítico y al fosfato γ del nucleótido entrante sugieren un papel en la unión al nucleótido y/o catálisis de la reacción de polimerización (Hopfner *et al.*, 1999). Nuestros datos bioquímicos, junto con la estructura cristalográfica del complejo ternario de las DNA polimerasas del tipo eucariótico, apoyan a un papel del residuo Glu486 en la coordinación de un tercer ion metálico en el centro activo de polimerización de la DNA polimerasa de $\phi 29$. Este metal sería crítico, no sólo para la incorporación del nucleótido sino también para la posible liberación de PPi (ver Figura 8A). La alta conservación de este residuo sugiere un papel similar como ligando de metal para los residuos Glu homólogos en el resto de DNA polimerasas de la familia B.

La presencia de un tercer ion metálico durante la catálisis de incorporación del nucleótido ha sido descrito recientemente para las DNA polimerasas β y η pertenecientes a las familias X e Y, respectivamente (Nakamura *et al.*, 2012; Freudenthal *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2016). Más específicamente, los recientes estudios cristalográficos llevados a cabo en Pol η han demostrado que el tercer ion metálico C es esencial para que se lleve a cabo la reacción de adición de nucleótido, siendo su unión al centro de polimerización el paso limitante de la reacción. El metal C no está coordinado por ningún residuo de la polimerasa pero su unión depende de la presencia de los iones A y B. Una vez unido, el metal C lleva a cabo la ruptura del enlace entre el fosfato α y β del nucleótido entrante, promoviendo la transferencia del grupo fosforilo al extremo 3'-OH de la cadena iniciadora que se desprotona para la formación del nuevo enlace fosfodiéster (Yang *et al.*, 2016). Estos resultados, junto con los estudios estructurales y bioquímicos realizados con las DNA polimerasas de la familia B RB69 (Franklin *et al.*, 2001; Zakharova *et al.*, 2004; Shamoo y Steitz, 1999) y $\phi 29$ (esta Tesis) apoyan la idea del tercer ion metálico como una característica general en el mecanismo de inserción de nucleótidos.

2. Importancia del *loop* del subdominio TPR1 para la correcta estabilización de la molécula iniciadora en el centro activo de polimerización.

Existe un grupo de DNA polimerasas capaces de usar proteínas para iniciar el proceso de replicación. La mayoría de estas DNA polimerasas, pertenecientes al subgrupo *Protein-priming* de la familia B, presentan una serie de adaptaciones estructurales que les permiten, además de iniciar la replicación usando una proteína como iniciador, tener una alta procesividad y capacidad de desplazamiento de banda, por lo que pueden sintetizar grandes longitudes de DNA

sin necesidad de proteínas tipo helicasas ni factores de procesividad. Estas dos características, procesividad y desplazamiento de banda, exigen una estrecha relación estructura-función. Tanto es así, que estas DNA polimerasas, como por ejemplo la DNA polimerasa del fago $\phi 29$, Nf o GA1 contienen dos subdominios denominados TPR1 y TPR2 (Terminal Protein Region), específicos de las DNA polimerasas del subgrupo de *protein-priming*. Estudios previos llevados a cabo sobre estas dos regiones en la DNA polimerasa de $\phi 29$ revelaron la importancia del subdominio TPR2 en conferir procesividad a la DNA polimerasa, así como en la apertura del DNA durante la replicación (desplazamiento de banda; Rodríguez *et al.*, 2005), mientras que el subdominio TPR1 establece las principales interacciones con la TP, además de contribuir a la correcta orientación tanto del extremo 3'-OH de una cadena iniciadora de DNA como del grupo OH de la Ser232 de la TP en el centro activo de polimerización (Dufour *et al.*, 2000; Dufour *et al.*, 2003). En esta Tesis hemos estudiado residuos del subdominio TPR1 localizados en el *loop* que se encuentra en la entrada del surco de unión de los sustratos de la polimerasa, DNA y TP.

2.1. Papel del *loop* del subdominio TPR1 en la estabilización del extremo del primer de DNA al centro activo de polimerización.

La DNA polimerasa del bacteriófago $\phi 29$ es capaz de llevar a cabo tanto la actividad de polimerización como la actividad de exonucleólisis 3'-5'. Cada una reside en dominios independientes. Ambas actividades deben estar perfectamente coordinadas para lograr una síntesis eficiente y sin errores. En condiciones estables de sal y temperatura y con un balance adecuado de los cuatro dNTPs, el factor que afecta principalmente el equilibrio entre ambas actividades es la estabilidad del extremo de la cadena iniciadora en cada centro activo, extremo que se une de manera preferente al centro activo de polimerización para dar lugar a la elongación de la cadena de DNA. Existen factores que reducen la estabilidad del extremo iniciador en el centro activo de polimerización como una baja fuerza iónica o la alta temperatura, pero el factor que más afecta la estabilidad es la presencia de un desapareamiento en el extremo, que provoca una disminución en la velocidad de polimerización, favoreciendo la unión del extremo 3' al centro activo de exonucleólisis.

Durante la caracterización bioquímica realizada sobre los residuos del *loop* del subdominio TPR1 de la DNA polimerasa de $\phi 29$, hemos visto que los mutantes Y310A, K311A y el mutante de delección $\Delta 6$ presentan un desbalance entre las actividades de exonucleólisis 3'-5' y de polimerización, teniendo lugar una mayor actividad exonucleolítica sobre DNA de cadena doble principalmente. La eliminación de la actividad exonucleasa permitió demostrar defectos adicionales en la inserción de nucleótidos, fundamentalmente debidos a una deficiente estabilización del extremo del *primer* en el centro activo de polimerización, como se deduce de los defectos observados en la interacción de las proteínas mutantes con la molécula sp1/sp1c+6. Por otra parte, las proteínas mutantes también mostraron una mayor actividad exonucleolítica

sobre ssDNA que el enzima *wild-type* debido a una mayor estabilización del DNA en el centro exonucleasa, como se deduce de los ensayos de unión a ssDNA. Estos resultados permiten proponer un papel del *loop* del subdominio TPR1 y más específicamente de los residuos Tyr310 y Lys311 en la estabilización preferente del extremo del *primer* al centro activo de polimerización, lo cual prevendría una degradación inicial del sustrato previa a la inserción de nucleótido. Estos resultados son similares a los obtenidos en el estudio de los residuos pertenecientes a los motivos KxY (Blasco *et al.*, 1995) y Tx₂GR (Méndez *et al.*, 1994), ambos presentes también en el dominio C-terminal de la DNA polimerasa de ϕ 29, en los cuales se vio que cambios en residuos de estos motivos provocaban una pérdida de unión o estabilidad entre la molécula iniciadora y las DNA polimerasas mutantes, presentando todas un aumento en la actividad exonucleolítica, así como un desbalance entre las actividades acopladas de polimerización/exonucleolisis (favoreciéndose esta última) y una síntesis de DNA disminuida en reacciones dependientes de DNA. Por lo tanto, estos dos motivos, junto con el *loop* del motivo TPR1 son responsables de la estabilización del extremo del *primer* en el centro activo de polimerización.

2.2. Papel del *loop* del subdominio TRP1 en la estabilización del dominio de iniciación de la TP al centro activo de polimerización

Numerosos estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, utilizando sobre todo el bacteriófago ϕ 29 y Adenovirus como sistemas modelo, apoyan los datos obtenidos sobre el mecanismo de replicación del DNA iniciado por proteína (Olovnikov 1973; Watson 1972; Kornberg y Baker 1992; González-Huici *et al.*, 2000). Inicialmente, las DNA polimerasas forman, con su correspondiente TP, un heterodímero que reconoce los orígenes de replicación localizados en ambos extremos del genoma linear y que se compone de una TP unida covalentemente en su extremo 5' y una secuencia específica de DNA. Seguidamente, la DNA polimerasa cataliza tanto la formación del complejo covalente entre la molécula libre de TP y el dAMP inicial, como su posterior elongación acoplada al desplazamiento de banda, al igual que ocurre en la replicación del TP-DNA de otros bacteriófagos como el PRD1 (Caldentey *et al.*, 1992; Caldentey *et al.*, 1993), Cp1 (Martín *et al.*, 1996), GA-1 (Illana *et al.*, 1996; Longas *et al.*, 2006) y Nf (González-Huici *et al.*, 2000, Longas *et al.*, 2006). Resultados previos obtenidos intercambiando las DNA polimerasas, TPs y TP-DNAs de los fagos Nf, GA-1 y ϕ 29 pusieron de manifiesto la gran especificidad entre la DNA polimerasa, la TP y el TP-DNA (Freire *et al.*, 1996; Longas *et al.*, 2006).

La obtención de la estructura cristalográfica de alta resolución del complejo DNA polimerasa/TP de ϕ 29 muestra que la TP posee tres dominios estructurales, el dominio C-terminal (también llamado *priming domain*), cargado negativamente y que se acomoda en el dominio de

polimerización de la polimerasa quedando envuelto por el dominio *thumb* y el subdominio TPR2, el dominio N-terminal y un dominio Intermedio, de carga positiva, cuya estructura es complementaria al subdominio TPR1 de la DNA polimerasa (Kamtekar *et al.*, 2006).

Tras la caracterización bioquímica de los residuos del *loop* pertenecientes al subdominio TPR1, se observa que los mutantes F309A, Y310A y $\Delta 6$ presentan defectos en la amplificación del TP-DNA, en la que el sustrato iniciador es la TP. Estos defectos son debidos a la incapacidad de llevar a cabo la reacción de iniciación de la replicación como consecuencia de una interacción deficiente con la TP iniciadora, como se deduce de los ensayos de interferencia así como de gradiente de glicerol. En el caso específico de los mutantes Y310A y $\Delta 6$, a estos defectos se le sumarían los anteriormente comentados en la estabilización del DNA en el centro de polimerización que hacen que prácticamente no se puedan detectar productos de amplificación del TP-DNA. En hecho de que la actividad de polimerización del mutante F309A se recupere o aumente significativamente si el sustrato es DNA, como en el caso de la replicación del DNA de M13 y de moléculas tipo iniciador/molde, sugiere un papel más específico de este residuo en la estabilización del dominio de iniciación de la TP en el centro activo de polimerización. Aunque el mutante F309A cosedimentaba con la TP, resultado que pareciera indicar que la estabilidad del heterodímero no está afectada por la mutación introducida, la pobre desoxinucleotidilación exhibida por la DNA polimerasa mutante en ausencia de molde, así como la falta de competición con la DNA polimerasa D249A que muestra el ensayo de interferencia, pueden estar reflejando una interacción estable (a diferencia de los mutantes Y310A y $\Delta 6$), pero no funcional con la TP, no siendo capaz de posicionar correctamente el dATP iniciador en el centro activo de polimerización. Por otra parte, el mutante R306A, si bien presentó defectos en la interacción con la TP, como se deduce del ensayo de interferencia y que dieron lugar a una reducida actividad de iniciación de la replicación, mostró unos niveles similares a los del enzima *wild-type* en la reacción de amplificación del TP-DNA. Este resultado podría estar indicando defectos en la *K_m* por el nucleótido iniciador que se manifestarían en la reacción de iniciación en la que se utilizan 0,2 μ M dATP y no en la de amplificación en la que la concentración de dATP es 400 veces superior. Por tanto, los residuos Arg306 y Phe309 podrían desempeñar un papel en la correcta orientación de la cadena lateral de la Ser232, haciendo que el grupo 3'-OH se coloque en la posición correcta para iniciar el proceso de replicación del DNA de $\phi 29$. Estos resultados apoyan el papel del subdominio TPR1 en el establecimiento de las interacciones necesarias para el mantenimiento del heterodímero en la reacción de iniciación, así como en la correcta orientación del dominio iniciador de la TP en el centro activo de la polimerasa. En este sentido, resultados previos derivados del estudio funcional de los residuos Asp332 y Leu342 del subdominio TPR1 mostraron como las mutaciones introducidas en ambos residuos afectaban específicamente la replicación del TP-DNA como consecuencia de una disminución en la eficiencia catalítica de las

reacciones iniciadas por TP debido a una interacción no funcional de las polimerasas mutantes con esta (Dufour *et al.*, 2000).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Mediante mutagénesis dirigida en el gen de la DNA polimerasa del bacteriófago $\phi 29$ hemos mostrado cómo las mutaciones introducidas en los codones que codifican los residuos de aminoácido Gly481 y Trp483 del motivo LExE disminuyen la eficiencia de inserción de nucleótidos de la DNA polimerasa, así como su actividad pirofosforolítica en presencia de iones Mg^{2+} , reacciones que se ven notablemente mejoradas cuando se utiliza Mn^{2+} como metal activador. Esos resultados, junto con la resolución cristalográfica previa del complejo ternario de la DNA polimerasa de $\phi 29$, nos permite inferir que la Gly481 y el Trp483 forman parte de un "bolsillo" hidrofóbico que orienta la Val250 para que ésta interaccione correctamente con el nucleótido entrante.
2. Mediante mutagénesis dirigida en el gen de la DNA polimerasa del bacteriófago $\phi 29$ hemos mostrado cómo las mutaciones introducidas en el codón que codifica el residuo de aminoácido Glu486 del motivo LExE da lugar a una variante mutante de la polimerasa que muestra una velocidad de replicación y una actividad pirofosforolítica deficientes en presencia de Mg^{2+} como metal activador. La recuperación de ambas reacciones con Mn^{2+} , junto con la resolución cristalográfica de DNA polimerasas de tipo eucariótico apoyan un papel para el Glu486 del motivo LExE en la interacción con el fosfato γ del nucleótido entrante a través de un potencial tercer ión metálico.
3. La fidelidad en la inserción de nucleótidos de las DNA polimerasas portadoras de sustituciones en las posiciones Gly481, Trp483, Ala484 y Glu486 fue muy inferior a la mostrada por el enzima *wild-type*. Considerando esos datos podemos proponer que los residuos del motivo LExE contribuyen a discriminar contra la inserción de un nucleótido incorrecto.
4. El subdominio TPR1 de las DNA polimerasas que inician la replicación utilizando una TP contiene un *loop* flexible a la entrada del surco de unión del DNA en el dominio de polimerización. Hemos mostrado cómo la sustitución de residuos específicos de dicho *loop* de la DNA polimerasa de $\phi 29$, como la Tyr310 y la Lys311, así como la delección del mismo dan lugar a variantes de la DNA polimerasa con mayor actividad exonucleolítica y reducida capacidad de polimerización debidas a una estabilización preferente del extremo de la cadena *primer* al centro activo exonucleasa. Estos resultados permiten proponer un papel para el *loop* del subdominio TPR1 en la estabilización del extremo de la cadena iniciadora de DNA en el centro activo de polimerización.
5. La sustitución individual de los residuos de aminoácido Arg306, Phe309, Tyr310 del *loop* del subdominio TPR1 de la polimerasa de $\phi 29$, así como la delección de dicho *loop* dan lugar a variantes de la polimerasa que presentan una interacción deficiente con la TP

iniciadora, permitiendo proponer un papel para el *loop* del subdominio TPR1 en la estabilización del dominio iniciador de la TP en el centro activo de polimerización.

BIBLIOGRAFÍA

Abbotts, J., SenGupta, D.N., Zmudzka, B., Widen, S.G., Notario, V. and Wilson, S.H. (1988) Expression of human DNA polymerase beta in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant enzyme. *Biochemistry*, **27**, 901-909.

Aoufouchi, S., Flatter, E., Dahan, A., Faili, A., Bertocci, B., Storck, S., Delbos, F., Cocea, L., Gupta, N., Weill, J.C. *et al.* (2000) Two novel human and mouse DNA polymerases of the polX family. *Nucleic Acids Res*, **28**, 3684-3693.

Aravind, L., Walker, D.R. and Koonin, E.V. (1999) Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems. *Nucleic Acids Res*, **27**, 1223-1242.

Arnold, E., Ding, J., Hughes, S.H. and Hostomsky, Z. (1995) Structures of DNA and RNA polymerases and their interactions with nucleic acid substrates. *Curr Opin Struct Biol*, **5**, 27-38.

Bailey, S., Wing, R.A. and Steitz, T.A. (2006) The structure of *T. aquaticus* DNA polymerase III is distinct from eukaryotic replicative DNA polymerases. *Cell*, **126**, 893-904.

Kornberg, A. and Baker, T.A. (1992) *DNA Replication*, second edn. New York: W.H. Freeman.

Baños, B., Lázaro, J.M., Villar, L., Salas, M. and de Vega, M. (2008) Characterization of a *Bacillus subtilis* 64-kDa DNA polymerase X potentially involved in DNA repair. *J Mol Biol*, **384**, 1019-1028.

Baños, B., Lázaro, J.M., Villar, L., Salas, M. and de Vega, M. (2008) Editing of misaligned 3'-termini by an intrinsic 3'-5' exonuclease activity residing in the PHP domain of a family X DNA polymerase. *Nucleic Acids Res*, **36**, 5736-5749.

Beard, W.A., Shock, D.D., Vande Berg, B.J. and Wilson, S.H. (2002) Efficiency of correct nucleotide insertion governs DNA polymerase fidelity. *J Biol Chem*, **277**, 47393-47398.

Bebenek, A., Carver, G.T., Dressman, H.K., Kadyrov, F.A., Haseman, J.K., Petrov, V., Konigsberg, W.H., Karam, J.D. and Drake, J.W. (2002) Dissecting the fidelity of bacteriophage RB69 DNA polymerase: site-specific modulation of fidelity by polymerase accessory proteins. *Genetics*, **162**, 1003-1018.

Bebenek, K. and Kunkel, T.A. (1995) Analyzing fidelity of DNA polymerases. *Methods*

Enzymol, **262**, 217-232.

Bebenek, K. and Kunkel, T.A. (2004) Functions of DNA polymerases. *Adv Protein Chem*, **69**, 137-165.

Bebenek, K., Matsuda, T., Masutani, C., Hanaoka, F. and Kunkel, T.A. (2001) Proofreading of DNA polymerase ϵ -dependent replication errors. *J Biol Chem*, **276**, 2317-2320.

Beese LS. and Steitz TA. (1991) Structural basis for the 3'-5' exonuclease activity of *Escherichia coli* DNA polymerase I: a two metal ion mechanism. *EMBO J* **10**: 25-33

Berman, A.J., Kamtekar, S., Goodman, J.L., Lázaro, J.M., de Vega, M., Blanco, L., Salas, M. and Steitz, T.A. (2007) Structures of ϕ 29 DNA polymerase complexed with substrate: the mechanism of translocation in B-family polymerases. *EMBO J*, **26**, 3494-3505.

Bernad, A., Blanco, L., Lázaro, J.M., Martin, G. and Salas, M. (1989) A conserved 3'-5' exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Cell*, **59**, 219-228.

Bernad, A., Blanco, L. and Salas, M. (1990) Site-directed mutagenesis of the YCDTDS amino acid motif of the ϕ 29 DNA polymerase. *Gene*, **94**, 45-51.

Blackburn, E.H. (2001) Switching and signaling at the telomere. *Cell*, **106**, 661-673.

Blanco, L., Bernad, A., Lázaro, J.M., Martin, G., Garmendia, C. and Salas, M. (1989) Highly efficient DNA synthesis by the phage ϕ 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J Biol Chem*, **264**, 8935-8940.

Blanco, L., García, J.A. and Salas, M. (1984) Cloning y expression of gene 2, required for the protein-primed initiation of the *Bacillus subtilis* phage ϕ 29 DNA replication. *Gene*, **29**, 33-40.

Blanco, L., Gutiérrez, J., Lázaro, J.M., Bernad, A. and Salas, M. (1986) Replication of phage ϕ 29 DNA in vitro: role of the viral protein p6 in initiation and elongation. *Nucleic Acids Res*, **14**, 4923-4937.

Blanco, L., Lázaro, J.M., de Vega, M., Bonnin, A. and Salas, M. (1994) Terminal protein-primed DNA amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 12198-12202.

Blanco, L., Prieto, I., Gutiérrez, J., Bernad, A., Lázaro, J.M., Hermoso, J.M. and Salas, M. (1987) Effect of NH₄⁺ ions on ϕ 29 DNA-protein p3 replication: formation of a complex between the terminal protein and the DNA polymerase. *J Virol*, **61**, 3983-3991.

Blanco L. and Salas M (1985a) Characterization of a 3'-5' exonuclease activity in the phage ϕ 29-encoded DNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **13**: 1239-1249

Blanco, L. and Salas, M. (1985b) Replication of phage ϕ 29 DNA with purified terminal protein and DNA polymerase: synthesis of full-length ϕ 29 DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**, 6404-6408.

Blanco, L. and Salas, M. (1995) Mutational analysis of bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase. *Methods Enzymol.*, **262**, 283-294.

Blanco, L. and Salas, M. (1996) Relating structure to function in ϕ 29 DNA polymerase. *J Biol Chem*, **271**, 8509-8512.

Blasco, M.A., Bernad, A., Blanco, L. and Salas, M. (1991) Characterization and mapping of the pyrophosphorolytic activity of the phage ϕ 29 DNA polymerase. Involvement of amino acid motifs highly conserved in alpha-like DNA polymerases. *J Biol Chem*, **266**, 7904-7909.

Blasco, M.A., Blanco, L., Pares, E., Salas, M. and Bernad, A. (1990) Structural and functional analysis of temperature-sensitive mutants of the phage ϕ 29 DNA polymerase. *Nucleic Acids Res*, **18**, 4763-4770.

Blasco, M.A., Esteban, J.A., Méndez, J., Blanco, L. and Salas, M. (1992) Structural and functional studies on ϕ 29 DNA polymerase. *Chromosoma*, **102**, S32-38.

Blasco, M.A., Lázaro, J.M., Blanco, L. and Salas, M. (1993a) ϕ 29 DNA polymerase active site. Residue ASP249 of conserved amino acid motif "Dx2SLYP" is critical for synthetic activities. *J Biol Chem*, **268**, 24106-24113.

Blasco, M.A., Méndez, J., Lázaro, J.M., Blanco, L. and Salas, M. (1995) Primer terminus stabilization at the ϕ 29 DNA polymerase active site. Mutational analysis of conserved motif KXY. *J Biol Chem*, **270**, 2735-2740.

Bogenhagen, D.F., Pinz, K.G. and Perez-Jannotti, R.M. (2001) Enzymology of mitochondrial

base excision repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **68**, 257-271.

Bollum, F.J. (1960) Oligodeoxyribonucleotide primers for calf thymus polymerase. *J Biol Chem*, **235**, PC18-20.

Bonnin, A., Lázaro, J.M., Blanco, L. and Salas, M. (1999) A single tyrosine prevents insertion of ribonucleotides in the eukaryotic-type ϕ 29 DNA polymerase. *J Mol Biol*, **290**, 241-251.

Bork, P., Hofmann, K., Bucher, P., Neuwald, A.F., Altschul, S.F. and Koonin, E.V. (1997) A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *FASEB J*, **11**, 68-76.

Braithwaite, D.K. and Ito, J. (1993) Compilation, alignment, y phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*, **21**, 787-802.

Brautigam, C.A. and Steitz, T.A. (1998) Structural y functional insights provided by crystal structures of DNA polymerases and their substrate complexes. *Curr Opin Struct Biol*, **8**, 54-63.

Bravo, A. and Salas, M. (1997) Initiation of bacteriophage ϕ 29 DNA replication in vivo: assembly of a membrane-associated multiprotein complex. *J Mol Biol*, **269**, 102-112.

Bruck, I., Goodman, M.F. and O'Donnell, M. (2003) The essential C family DnaE polymerase is error-prone and efficient at lesion bypass. *J Biol Chem*, **278**, 44361-44368.

Callebaut, I. and Mornon, J.P. (1997) From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. *FEBS Lett*, **400**, 25-30.

Cann, I.K., Komori, K., Toh, H., Kanai, S. and Ishino, Y. (1998) A heterodimeric DNA polymerase: evidence that members of *Euryarchaeota* possess a distinct DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14250-14255.

Capson, T.L., Peliska, J.A., Kaboord, B.F., Frey, M.W., Lively, C., Dahlberg, M. and Benkovic, S.J. (1992) Kinetic characterization of the polymerase and exonuclease activities of the gene 43 protein of bacteriophage T4. *Biochemistry*, **31**, 10984-10994.

Chan, S.H., Yu, A.M. and McVey, M. (2010) Dual roles for DNA polymerase theta in alternative end-joining repair of double-strand breaks in *Drosophila*. *PLoS Genet*, **6**, e1001005.

Collins, K. and Mitchell, J.R. (2002) Telomerase in the human organism. *Oncogene*, **21**, 564-579.

Creighton, S., Bloom, L.B. and Goodman, M.F. (1995) Gel fidelity assay measuring nucleotide misinsertion, exonucleolytic proofreading, and lesion bypass efficiencies. *Methods Enzymol*, **262**, 232-256.

Crespan, E., Maga, G. and Hubscher, U. (2011) A new proofreading mechanism for lesion bypass by DNA polymerase-lambda. *EMBO Rep*, **13**, 68-74.

de Vega, M., Ilyina, T., Lázaro, J.M., Salas, M. and Blanco, L. (1997) An invariant lysine residue is involved in catalysis at the 3'-5' exonuclease active site of eukaryotic-type DNA polymerases. *J Mol Biol*, **270**, 65-78.

de Vega, M., Lázaro, J.M., Salas, M. and Blanco, L. (1996) Primer-terminus stabilization at the 3'-5' exonuclease active site of ϕ 29 DNA polymerase. Involvement of two amino acid residues highly conserved in proofreading DNA polymerases. *EMBO J*, **15**, 1182-1192.

de Vega, M., Lázaro, J.M., Salas, M. and Blanco, L. (1998) Mutational analysis of ϕ 29 DNA polymerase residues acting as ssDNA ligands for 3'-5' exonucleolysis. *J Mol Biol*, **279**, 807-822.

de Vega, M., Blanco, L. and Salas, M. (1999) Processive proofreading and the spatial relationship between polymerase and exonuclease active sites of bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase. *J Mol Biol*, **292**, 39-51.

Dean, F.B., Nelson, J.R., Giesler, T.L. and Lasken, R.S. (2001) Rapid amplification of plasmid and phage DNA using ϕ 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res*, **11**, 1095-1099.

Delarue, M., Poch, O., Tordo, N., Moras, D. and Argos, P. (1990) An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Eng*, **3**, 461-467.

Dervyn, E., Suski, C., Daniel, R., Bruand, C., Chapuis, J., Errington, J., Janniere, L. and Ehrlich, S.D. (2001) Two essential DNA polymerases at the bacterial replication fork. *Science*, **294**, 1716-1719.

Domínguez, O., Ruíz, J.F., Laín de Lera, T., García-Díaz, M., González, M.A., Kirchhoff, T., Martínez, A.C., Bernad, A. and Blanco, L. (2000) DNA polymerase mu (Pol mu), homologous to TdT, could act as a DNA mutator in eukaryotic cells. *EMBO J*, **19**, 1731-1742.

Doublet, S., Tabor, S., Long, A.M., Richardson, C.C. and Ellenberger, T. (1998) Crystal structure of a bacteriophage T7 DNA replication complex at 2.2 Å resolution. *Nature*, **391**, 251-258.

Dufour, E., Méndez, J., Lázaro, J.M., de Vega, M., Blanco, L. and Salas, M. (2000) An aspartic acid residue in TPR-1, a specific region of protein-priming DNA polymerases, is required for the functional interaction with primer terminal protein. *J Mol Biol*, **304**, 289-300.

Dufour, E., Rodríguez, I., Lázaro, J.M., de Vega, M. and Salas, M. (2003) A conserved insertion in protein-primed DNA polymerases is involved in primer terminus stabilisation. *J Mol Biol*, **331**, 781-794.

Eom, S.H., Wang, J. and Steitz, T.A. (1996) Structure of Taq polymerase with DNA at the polymerase active site. *Nature*, **382**, 278-281.

Esteban, J.A., Salas, M. and Blanco, L. (1993) Fidelity of ϕ 29 DNA polymerase. Comparison between protein-primed initiation and DNA polymerization. *J Biol Chem*, **268**, 2719-2726.

Esteban, J.A., Soengas, M.S., Salas, M. and Blanco, L. (1994) 3'→5' exonuclease active site of ϕ 29 DNA polymerase. Evidence favoring a metal ion-assisted reaction mechanism. *J Biol Chem*, **269**, 31946-31954.

Franklin, M.C., Wang, J. and Steitz, T.A. (2001) Structure of the replicating complex of a pol alpha family DNA polymerase. *Cell*, **105**, 657-667.

Freemont PS., Friedman JM., Beese LS., Sanderson MR. and Steitz TA. (1988) Cocystal structure of an editing complex of Klenow fragment with DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 8924-8928.

Freudenthal, B.D., Beard, W.A., Shock, D.D. and Wilson, S.H. (2013) Observing a DNA polymerase choose right from wrong. *Cell*, **154**, 157-168.

Friedberg, E.C., Wagner, R. and Radman, M. (2002) Specialized DNA polymerases, cellular survival, and the genesis of mutations. *Science*, **296**, 1627-1630.

García-Díaz, M., Domínguez, O., López-Fernández, L.A., de Lera, L.T., Saniger, M.L., Ruíz, J.F., Parraga, M., García-Ortiz, M.J., Kirchhoff, T., del Mazo, J. *et al.* (2000) DNA polymerase lambda (Pol lambda), a novel eukaryotic DNA polymerase with a potential role in meiosis. *J Mol Biol*, **301**, 851-867.

García-Gómez, S., Reyes, A., Martínez-Jiménez, M.I., Chocron, E.S., Mouron, S., Terrados, G., Powell, C., Salido, E., Méndez, J., Holt, I.J. *et al.* (2013) PrimPol, an archaic primase/polymerase operating in human cells. *Mol Cell*, **52**, 541-553.

Garg P. and Burgers, PM. (2005) DNA polymerases that propagate the eukaryotic DNA replication fork. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **40**: 115-128

Garmendia, C., Bernad, A., Esteban, J.A., Blanco, L. and Salas, M. (1992) The bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase, a proofreading enzyme. *J Biol Chem*, **267**, 2594-2599.

Glover, B.P. and McHenry, C.S. (2001) The DNA polymerase III holoenzyme: an asymmetric dimeric replicative complex with leading and lagging strand polymerases. *Cell*, **105**, 925-934.

Goodman, M.F. (2002) Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Biochem*, **71**, 17-50.

Goodrich, L.D., Lin, T.C., Spicer, E.K., Jones, C. and Konigsberg, W.H. (1997) Residues at the carboxy terminus of T4 DNA polymerase are important determinants for interaction with the polymerase accessory proteins. *Biochemistry*, **36**, 10474-10481.

Gotte, M., Li, X. and Wainberg, M.A. (1999) HIV-1 reverse transcription: a brief overview focused on structure-function relationships among molecules involved in initiation of the reaction. *Arch Biochem Biophys*, **365**, 199-210.

Graziewicz, M.A., Longley, M.J. and Copeland, W.C. (2006) DNA polymerase gamma in mitochondrial DNA replication and repair. *Chem Rev*, **106**, 383-405.

Greenough, L., Menin, J.F., Desai, N.S., Kelman, Z. and Gardner, A.F. (2014) Characterization of family D DNA polymerase from *Thermococcus* sp. 9 degrees N. *Extremophiles*, **18**, 653-664.

Gueguen, Y., Rolland, J.L., Lecompte, O., Azam, P., Le Romancer, G., Flament, D., Raffin, J.P.

and Dietrich, J. (2001) Characterization of two DNA polymerases from the hyperthermophilic euryarchaeon *Pyrococcus abyssi*. *Eur J Biochem*, **268**, 5961-5969.

Gutiérrez, J., Vinós, J., Prieto, I., Méndez, E., Hermoso, J.M. and Salas, M. (1986) Signals in the phi 29 DNA-terminal protein template for the initiation of phage ϕ 29 DNA replication. *Virology*, **155**, 474-483.

Hamdan, S., Bulloch, E.M., Thompson, P.R., Beck, J.L., Yang, J.Y., Crowther, J.A., Lilley, P.E., Carr, P.D., Ollis, D.L., Brown, S.E. *et al.* (2002) Hydrolysis of the 5'-p-nitrophenyl ester of TMP by the proofreading exonuclease (epsilon) subunit of Escherichia coli DNA polymerase III. *Biochemistry*, **41**, 5266-5275.

Hermoso, J.M., Méndez, E., Soriano, F. and Salas, M. (1985) Location of the serine residue involved in the linkage between the terminal protein and the DNA of phage ϕ 29. *Nucleic Acids Res*, **13**, 7715-7728.

Hopfner, K.P., Eichinger, A., Engh, R.A., Laue, F., Ankenbauer, W., Huber, R. and Angerer, B. (1999) Crystal structure of a thermostable type B DNA polymerase from *Thermococcus gorgonarius*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 3600-3605.

Inciarte, M.R., Vinuela, E. and Salas, M. (1976) Transcription in vitro of ϕ 29 DNA and EcoRI fragments by *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *Eur J Biochem*, **71**, 77-83.

Ito, J. and Braithwaite, D.K. (1991) Compilation and alignment of DNA polymerase sequences. *Nucleic Acids Res*, **19**, 4045-4057.

Jacobo-Molina, A., Ding, J., Nanni, R.G., Clark, A.D., Jr., Lu, X., Tantillo, C., Williams, R.L., Kamer, G., Ferris, A.L., Clark, P. *et al.* (1993) Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 6320-6324.

Johnson, S.J. and Beese, L.S. (2004) Structures of mismatch replication errors observed in a DNA polymerase. *Cell*, **116**, 803-816.

Joyce, C.M. (1997) Choosing the right sugar: how polymerases select a nucleotide substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 1619-1622.

Joyce, C.M. and Steitz, T.A. (1994) Function and structure relationships in DNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 777-822.

Joyce, C.M. and Steitz, T.A. (1995) Polymerase structures and function: variations on a theme? *J Bacteriol*, **177**, 6321-6329.

Kaguni, L.S. (2004) DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase. *Annu Rev Biochem*, **73**, 293-320.

Kamtekar, S., Berman, A.J., Wang, J., Lázaro, J.M., de Vega, M., Blanco, L., Salas, M. and Steitz, T.A. (2004) Insights into strand displacement and processivity from the crystal structure of the protein-primed DNA polymerase of bacteriophage $\phi 29$. *Mol Cell*, **16**, 609-618.

Kamtekar, S., Berman, A.J., Wang, J., Lázaro, J.M., de Vega, M., Blanco, L., Salas, M. and Steitz, T.A. (2006) The $\phi 29$ DNA polymerase: protein-primer structure suggests a model for the initiation to elongation transition. *EMBO J*, **25**, 1335-1343.

Kelman, Z. and O'Donnell, M. (1995) DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine. *Annu Rev Biochem*, **64**, 171-200.

Kiefer, J.R., Mao, C., Braman, J.C. and Beese, L.S. (1998) Visualizing DNA replication in a catalytically active *Bacillus* DNA polymerase crystal. *Nature*, **391**, 304-307.

Kohlstaedt, L.A., Wang, J., Friedman, J.M., Rice, P.A. and Steitz, T.A. (1992) Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science*, **256**, 1783-1790.

Kulaeva, O.I., Koonin, E.V., McDonald, J.P., Randall, S.K., Rabinovich, N., Connaughton, J.F., Levine, A.S. and Woodgate, R. (1996) Identification of a DinB/UmuC homolog in the archeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mutat Res*, **357**, 245-253.

Kunkel, T.A. and Bebenek, K. (2000) DNA replication fidelity. *Annu Rev Biochem*, **69**, 497-529.

Kunkel, T.A. and Wilson, S.H. (1998) DNA polymerases on the move. *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 95-99.

Lamers, M.H., Georgescu, R.E., Lee, S.G., O'Donnell, M. and Kuriyan, J. (2006) Crystal

structure of the catalytic alpha subunit of *E. coli* replicative DNA polymerase III. *Cell*, **126**, 881-892.

Langston, L.D. and O'Donnell, M. (2006) DNA replication: Keep moving and don't mind the gap. *Mol. Cell*, **23**, 155-160

Lawrence, C.W. (2004) Cellular functions of DNA polymerase zeta and Rev1 protein. *Adv Protein Chem*, **69**, 167-203.

Lázaro, J.M., Blanco, L. and Salas, M. (1995) Purification of bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase. *Methods Enzymol*, **262**, 42-49.

Lehman IR., Bessman MJ., Simms ES. and Kornberg A. (1958) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. I. Preparation of substrates and partial purification of an enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **233**: 163-170.

Lin, T.C., Karam, G. and Konigsberg, W.H. (1994) Isolation, characterization, and kinetic properties of truncated forms of T4 DNA polymerase that exhibit 3'-5' exonuclease activity. *J Biol Chem*, **269**, 19286-19294.

Lyamichev, V., Brow, M.A. and Dahlberg, J.E. (1993) Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases. *Science*, **260**, 778-783.

Martin, G., Lázaro, J.M., Méndez, E. and Salas, M. (1989) Characterization of the phage ϕ 29 protein p5 as a single-stranded DNA binding protein. Function in ϕ 29 DNA-protein p3 replication. *Nucleic Acids Res*, **17**, 3663-3672.

Matsumoto, Y. and Kim, K. (1995) Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. *Science*, **269**, 699-702.

McCulloch, S.D., Kokoska, R.J. and Kunkel, T.A. (2004) Efficiency, fidelity and enzymatic switching during translesion DNA synthesis. *Cell Cycle*, **3**, 580-583.

McDonald, J.P., Rapic-Otrin, V., Epstein, J.A., Broughton, B.C., Wang, X., Lehmann, A.R., Wolgemuth, D.J. and Woodgate, R. (1999) Novel human and mouse homologs of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase eta. *Genomics*, **60**, 20-30.

- McDonell, M.W., Simon, M.N. and Studier, F.W. (1977) Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol*, **110**, 119-146.
- McHenry, C.S. (2003) Chromosomal replicases as asymmetric dimers: studies of subunit arrangement and functional consequences. *Mol Microbiol*, **49**, 1157-1165.
- Meijer, W.J., Horcajadas, J.A. and Salas, M. (2001) ϕ 29 family of phages. *Microbiol Mol Biol Rev*, **65**, 261-287 ; second page, table of contents.
- Mencia M., Gella P., Camacho A., de Vega M. and Salas M. (2011) Terminal protein-primed amplification of heterologous DNA with a minimal replication system based on phage ϕ 29. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 18655-18660
- Méndez, J., Blanco, L., Esteban, J.A., Bernad, A. and Salas, M. (1992) Initiation of phi 29 DNA replication occurs at the second 3' nucleotide of the linear template: a sliding-back mechanism for protein-primed DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 9579-9583.
- Méndez, J., Blanco, L., Lázaro, J.M. and Salas, M. (1994) Primer-terminus stabilization at the ϕ 29 DNA polymerase active site. Mutational analysis of conserved motif TX2GR. *J Biol Chem*, **269**, 30030-30038.
- Méndez, J., Blanco, L. and Salas, M. (1997) Protein-primed DNA replication: a transition between two modes of priming by a unique DNA polymerase. *EMBO J*, **16**, 2519-2527.
- Minnick, D.T., Astatke, M., Joyce, C.M. and Kunkel, T.A. (1996) A thumb subdomain mutant of the large fragment of Escherichia coli DNA polymerase I with reduced DNA binding affinity, processivity, and frameshift fidelity. *J Biol Chem*, **271**, 24954-24961.
- Moelling, K., Bolognesi, D.P. and Bauer, H. (1971) Polypeptides of avian RNA tumor viruses. 3. Purification and identification of a DNA synthesizing enzyme. *Virology*, **45**, 298-302.
- Moldovan, G.L., Pfander, B. and Jentsch, S. (2007) PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell*, **129**, 665-679.
- Mouron, S., Rodríguez-Acebes, S., Martínez-Jiménez, M.I., García-Gómez, S., Chocron, S., Blanco, L. and Méndez, J. (2013) Repriming of DNA synthesis at stalled replication forks by

human PrimPol. *Nat Struct Mol Biol*, **20**, 1383-1389.

Nagasawa, K., Kitamura, K., Yasui, A., Nimura, Y., Ikeda, K., Hirai, M., Matsukage, A. and Nakanishi, M. (2000) Identification and characterization of human DNA polymerase beta 2, a DNA polymerase beta -related enzyme. *J Biol Chem*, **275**, 31233-31238.

Nakamura, T., Zhao, Y., Yamagata, Y., Hua, Y.J. and Yang, W. (2012) Watching DNA polymerase eta make a phosphodiester bond. *Nature*, **487**, 196-201.

Nelson, J.R., Lawrence, C.W. and Hinkle, D.C. (1996) Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase zeta. *Science*, **272**, 1646-1649.

Nick McElhinny, S.A., Stith, C.M., Burgers, P.M. and Kunkel, T.A. (2007) Inefficient proofreading and biased error rates during inaccurate DNA synthesis by a mutant derivative of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase δ . *J. Biol. Chem.*, **282**, 2324-2332.

Nuutinen, T., Tossavainen, H., Fredriksson, K., Pirila, P., Permi, P., Pospiech, H. and Syvaoja, J.E. (2008) The solution structure of the amino-terminal domain of human DNA polymerase epsilon subunit B is homologous to C-domains of AAA+ proteins. *Nucleic Acids Res*, **36**, 5102-5110.

Ohashi, E., Bebenek, K., Matsuda, T., Feaver, W.J., Gerlach, V.L., Friedberg, E.C., Ohmori, H. and Kunkel, T.A. (2000) Fidelity and processivity of DNA synthesis by DNA polymerase kappa, the product of the human DINB1 gene. *J Biol Chem*, **275**, 39678-39684.

Ohmori, H., Friedberg, E.C., Fuchs, R.P., Goodman, M.F., Hanaoka, F., Hinkle, D., Kunkel, T.A., Lawrence, C.W., Livneh, Z., Nohmi, T. *et al.* (2001) The Y-family of DNA polymerases. *Mol Cell*, **8**, 7-8.

Oliveros, M., Yañez, R.J., Salas, M.L., Salas, J., Viñuela, E. and Blanco, L. (1997) Characterization of an African swine fever virus 20-kDa DNA polymerase involved in DNA repair. *J Biol Chem*, **272**, 30899-30910.

Paces, V., Vlcek, C., Urbanek, P. and Hostomsky, Z. (1986) Nucleotide sequence of the right early region of *Bacillus subtilis* phage PZA completes the 19366-bp sequence of PZA genome. Comparison with the homologous sequence of phage ϕ 29. *Gene*, **44**, 115-120.

- Patel, P.H., Jacobo-Molina, A., Ding, J., Tantillo, C., Clark, A.D., Jr., Raag, R., Nanni, R.G., Hughes, S.H. and Arnold, E. (1995) Insights into DNA polymerization mechanisms from structure and function analysis of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry*, **34**, 5351-5363.
- Patel, P.H., Kawate, H., Adman, E., Ashbach, M. and Loeb, L.A. (2001a) A single highly mutable catalytic site amino acid is critical for DNA polymerase fidelity. *J Biol Chem*, **276**, 5044-5051.
- Patel, P.H., Suzuki, M., Adman, E., Shinkai, A. and Loeb, L.A. (2001b) Prokaryotic DNA polymerase I: evolution, structure, and "base flipping" mechanism for nucleotide selection. *J Mol Biol*, **308**, 823-837.
- Pelletier, H., Sawaya, M.R., Wolfle, W., Wilson, S.H. and Kraut, J. (1996) Crystal structures of human DNA polymerase beta complexed with DNA: implications for catalytic mechanism, processivity, and fidelity. *Biochemistry*, **35**, 12742-12761.
- Peñalva, M.A. and Salas, M. (1982) Initiation of phage ϕ 29 DNA replication in vitro: formation of a covalent complex between the terminal protein, p3, and 5'-dAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 5522-5526.
- Pérez-Arnáiz, P., Lázaro, J.M., Salas, M. and de Vega, M. (2010) ϕ 29 DNA polymerase active site: role of residue Val250 as metal-dNTP complex ligand and in protein-primed initiation. *J Mol Biol*, **395**, 223-233.
- Pérez-Arnáiz, P., Longás, E., Villar, L., Lázaro, J.M., Salas, M. and de Vega, M. (2007) Involvement of phage ϕ 29 DNA polymerase and terminal protein subdomains in conferring specificity during initiation of protein-primed DNA replication. *Nucleic Acids Res*, **35**, 7061-7073.
- Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M. and Tordo, N. (1989) Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J*, **8**, 3867-3874.
- Pursell, Z.F., Isoz, I., Lundstrom, E.B., Johansson, E. and Kunkel, T.A. (2007) Regulation of B family DNA polymerase fidelity by a conserved active site residue: characterization of M644W, M644L and M644F mutants of yeast DNA polymerase epsilon. *Nucleic Acids Res*, **35**, 3076-3086.
- Rodríguez, I., Lázaro, J.M., Blanco, L., Kamtekar, S., Berman, A.J., Wang, J., Steitz, T.A., Salas,

M. and de Vega, M. (2005) A specific subdomain in ϕ 29 DNA polymerase confers both processivity and strand-displacement capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 6407-6412.

Ruíz, J.F., Juárez, R., García-Díaz, M., Terrados, G., Picher, A.J., González-Barrera, S., Fernandez de Henestrosa, A.R. and Blanco, L. (2003) Lack of sugar discrimination by human Pol mu requires a single glycine residue. *Nucleic Acids Res*, **31**, 4441-4449.

Salas M (1999) Mechanisms of initiation of linear DNA replication in prokaryotes. *Genet Eng (N Y)* **21**: 159-171

Salas, M. (1991) Protein-priming of DNA replication. *Annu Rev Biochem*, **60**, 39-71.

Salas, M., and de Vega, M. (2008) in *Encyclopedia of Virology* (Mahy, B. W., and Regenmortel, M. H., eds) 3rd Ed., pp. 339–406, Elsevier, Oxford

Saturno, J., Blanco, L., Salas, M. and Esteban, J.A. (1995) A novel kinetic analysis to calculate nucleotide affinity of proofreading DNA polymerases. Application to ϕ 29 DNA polymerase fidelity mutants. *J Biol Chem*, **270**, 31235-31243.

Saturno, J., Lázaro, J.M., Esteban, F.J., Blanco, L. and Salas, M. (1997) ϕ 29 DNA polymerase residue Lys383, invariant at motif B of DNA-dependent polymerases, is involved in dNTP binding. *J Mol Biol*, **269**, 313-325.

Sawaya, M.R., Prasad, R., Wilson, S.H., Kraut, J. and Pelletier, H. (1997) Crystal structures of human DNA polymerase beta complexed with gapped and nicked DNA: evidence for an induced fit mechanism. *Biochemistry*, **36**, 11205-11215.

Saxowsky, T.T., Matsumoto, Y. and Englund, P.T. (2002) The mitochondrial DNA polymerase beta from *Crithidia fasciculata* has 5'-deoxyribose phosphate (dRP) lyase activity but is deficient in the release of dRP. *J Biol Chem*, **277**, 37201-37206.

Serrano, M., Gutiérrez, J., Prieto, I., Hermoso, J.M. and Salas, M. (1989) Signals at the bacteriophage ϕ 29 DNA replication origins required for protein p6 binding and activity. *EMBO J*, **8**, 1879-1885.

Shamoo, Y. and Steitz, T.A. (1999) Building a replisome from interacting pieces: sliding clamp complexed to a peptide from DNA polymerase and a polymerase editing complex. *Cell*, **99**, 155-

166.

Shen, Y., Musti, K., Hiramoto, M., Kikuchi, H., Kawarabayashi, Y. and Matsui, I. (2001) Invariant Asp-1122 and Asp-1124 are essential residues for polymerization catalysis of family D DNA polymerase from *Pyrococcus horikoshii*. *J Biol Chem*, **276**, 27376-27383.

Shinkai, A. and Loeb, L.A. (2001) In vivo mutagenesis by *Escherichia coli* DNA polymerase I. Ile(709) in motif A functions in base selection. *J Biol Chem*, **276**, 46759-46764.

Singhal, R.K. and Wilson, S.H. (1993) Short gap-filling synthesis by DNA polymerase beta is processive. *J Biol Chem*, **268**, 15906-15911.

Sobol, R.W. and Wilson, S.H. (2001) Mammalian DNA beta-polymerase in base excision repair of alkylation damage. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **68**, 57-74.

Soengas, M.S., Esteban, J.A., Lázaro, J.M., Bernad, A., Blasco, M.A., Salas, M. and Blanco, L. (1992) Site-directed mutagenesis at the Exo III motif of ϕ 29 DNA polymerase; overlapping structural domains for the 3'-5' exonuclease and strand-displacement activities. *EMBO J*, **11**, 4227-4237.

Soengas, M.S., Gutiérrez, C. and Salas, M. (1995) Helix-destabilizing activity of ϕ 29 single-stranded DNA binding protein: effect on the elongation rate during strand displacement DNA replication. *J Mol Biol*, **253**, 517-529.

Steitz, T.A. (1998) A mechanism for all polymerases. *Nature*, **391**, 231-232.

Steitz, T.A., Smerdon, S.J., Jager, J. and Joyce, C.M. (1994) A unified polymerase mechanism for nonhomologous DNA and RNA polymerases. *Science*, **266**, 2022-2025.

Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, **189**, 113-130.

Truniger, V., Lázaro, J.M., de Vega, M., Blanco, L. and Salas, M. (2003) ϕ 29 DNA polymerase residue Leu384, highly conserved in motif B of eukaryotic type DNA replicases, is involved in nucleotide insertion fidelity. *J Biol Chem*, **278**, 33482-33491.

Truniger, V., Lázaro, J.M., Esteban, F.J., Blanco, L. and Salas, M. (2002) A positively charged

residue of ϕ 29 DNA polymerase, highly conserved in DNA polymerases from families A and B, is involved in binding the incoming nucleotide. *Nucleic Acids Res*, **30**, 1483-1492.

Truniger, V., Lázaro, J.M. and Salas, M. (2004a) Function of the C-terminus of ϕ 29 DNA polymerase in DNA and terminal protein binding. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 361-370.

Truniger, V., Lázaro, J.M. and Salas, M. (2004b) Two positively charged residues of ϕ 29 DNA polymerase, conserved in protein-primed DNA polymerases, are involved in stabilisation of the incoming nucleotide. *J Mol Biol*, **335**, 481-494.

Truniger, V., Lázaro, J.M., Salas, M. and Blanco, L. (1996) A DNA binding motif coordinating synthesis and degradation in proofreading DNA polymerases. *EMBO J*, **15**, 3430-3441.

Uemori, T., Sato, Y., Kato, I., Doi, H. and Ishino, Y. (1997) A novel DNA polymerase in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*: gene cloning, expression, and characterization. *Genes Cells*, **2**, 499-512.

Wang, J., Sattar, A.K., Wang, C.C., Karam, J.D., Konigsberg, W.H. and Steitz, T.A. (1997) Crystal structure of a pol alpha family replication DNA polymerase from bacteriophage RB69. *Cell*, **89**, 1087-1099.

Wong, I., Patel, S.S. and Johnson, K.A. (1991) An induced-fit kinetic mechanism for DNA replication fidelity: direct measurement by single-turnover kinetics. *Biochemistry*, **30**, 526-537.

Yamanaka, K., Minko, I.G., Takata, K., Kolbanovskiy, A., Kozekov, I.D., Wood, R.D., Rizzo, C.J. and Lloyd, R.S. (2010) Novel enzymatic function of DNA polymerase nu in translesion DNA synthesis past major groove DNA-peptide and DNA-DNA cross-links. *Chem Res Toxicol*, **23**, 689-695.

Yamasaki, K., Urushibata, Y., Yamasaki, T., Arisaka, F. and Matsui, I. (2010) Solution structure of the N-terminal domain of the archaeal D-family DNA polymerase small subunit reveals evolutionary relationship to eukaryotic B-family polymerases. *FEBS Lett*, **584**, 3370-3375.

Yang, G., Lin, T., Karam, J. and Konigsberg, W.H. (1999) Steady-state kinetic characterization of RB69 DNA polymerase mutants that affect dNTP incorporation. *Biochemistry*, **38**, 8094-8101.

Yang, W. (2003) Damage repair DNA polymerases Y. *Curr Opin Struct Biol*, **13**, 23-30.

Yin, Y.W. and Steitz, T.A. (2004) The structural mechanism of translocation and helicase activity in T7 RNA polymerase. *Cell*, **116**, 393-404.

Yoon, J.H., Roy Choudhury, J., Park, J., Prakash, S. and Prakash, L. (2014) A role for DNA polymerase theta in promoting replication through oxidative DNA lesion, thymine glycol, in human cells. *J Biol Chem*, **289**, 13177-13185.

Zakharova, E., Wang, J. and Konigsberg, W. (2004) The activity of selected RB69 DNA polymerase mutants can be restored by manganese ions: the existence of alternative metal ion ligands used during the polymerization cycle. *Biochemistry*, **43**, 6587-6595.

Zhou, B.L., Pata, J.D. and Steitz, T.A. (2001) Crystal structure of a DinB lesion bypass DNA polymerase catalytic fragment reveals a classic polymerase catalytic domain. *Mol Cell*, **8**, 427-437.